

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biochemie



***N*-oxidy morfinanových alkaloidů**

***N*-oxides of morphinan alkaloids**

Bakalářská práce

Martin Palušák

Vedoucí práce: RNDr. Helena Dračínská, Ph.D.

Konzultant: Ing. Radek Pohl, Ph.D.

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně pod vedením Ing. Radka Pohla, Ph.D. a RNDr. Heleny Dračínské, Ph.D. a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 19. 5. 2016

.....

podpis

## **Poděkování:**

Touto cestou bych rád poděkoval Ing. Radku Pohlovi, Ph.D. a RNDr. Martinu Dračínskému, Ph.D. za trpělivou a vytrvalou pomoc při vysvětlování metody NMR a za skvěle vytvořené pracovní prostředí, kterým mě doprovázeli po celou dobu mého projektu.

Dále bych rád poděkoval RNDr. Heleně Dračínské, Ph.D. za věcné rady a připomínky při vypracovávání mé bakalářské práce.

## Abstrakt:

Morfinanové alkaloidy patří mezi důležité látky při léčbě a potlačení bolesti. Pochopení účinku těchto látek je důležité pro zdokonalení léčby pomocí těchto alkaloidů, například při syntéze nových derivátů se zvýšenými účinky. Tato práce má za cíl shrnout dosavadní znalosti o těchto látkách od jejich biosyntézy v rostlinách, až po celkový účinek na organismus. Cílem praktické části práce je pak určit relativní konfiguraci morfinanových *N*-oxidů vzniklých *in situ* oxidací výchozích alkaloidů pomocí NMR spektroskopie a molekulového modelování.

Pomocí NMR spektroskopie byly určeny relativní konfigurace oxidovaných i neoxidovaných forem morfinu, kodeinu a tebainu a zjištěn poměr vzniklých *N*-oxidů *in situ*. Tyto výsledky byly porovnány s kvantově chemickými výpočty provedenými metodou DFT. Porovnáním obou metod byla ověřena spolehlivost zvolené výpočetní metody.

**Klíčová slova:** NMR spektroskopie, morfin, kodein, tebain, *N*-oxidy, metabolismus alkaloidů

**Abstract:**

Morphinan alkaloids belong to important class of compounds acting as painkillers. Understanding of the mechanism of their action is important for improved therapy using these alkaloids, for example, through the synthesis of new analogues with improved effect. The goal of this work is to summarize existing knowledge of these compounds including information about their biosynthesis in the plants and overall effect on the organism. The goal of the practical part of the work is a determination of the relative configuration of morphinan *N*-oxides produced by *in situ* oxidation of parent alkaloids using NMR spectroscopy and molecular modelling.

Relative configurations of both oxidized and non-oxidized forms of morphine, codeine and thebaine were analyzed using NMR spectroscopy. NMR spectra were analyzed to detect ratio of different N-oxide products *in situ*. These values were compared with results of DFT quantum chemical computation. Using correlation analysis, reliability of computational method was verified.

(in Czech)

**Key words:** NMR spectroscopy, morphine, codeine, thebaine, *N*-oxides, metabolism of alkaloids

## Obsah

Seznam zkratk.....	7
1 Teoretický úvod.....	8
1.1 Opiové alkaloidy .....	8
1.2 Zastoupení alkaloidů v rostlině .....	8
1.3 Struktura a vlastnosti.....	9
1.4 Biosyntéza morfinanových alkaloidů.....	9
1.5 Příprava a využití morfinanových alkaloidů .....	11
1.6 Farmakodynamika morfinanových alkaloidů .....	12
1.6.1 Opiové receptory .....	12
1.6.2 Vliv morfinanových alkaloidů na genovou expresi.....	14
1.7 Farmakokinetika morfinanových alkaloidů .....	15
1.8 Farmakokinetika morfinu.....	15
1.8.1 Morfin-3-glukuronid a morfin-6-glukuronid.....	16
1.8.2 Normorfin .....	16
1.8.3 Morfin-3-sulfát a morfin-6-sulfát .....	17
1.9 Farmakokinetika kodeinu.....	18
1.9.1 Kodein-6-glukunorid .....	18
1.9.2 Norkodein .....	18
1.10 Farmakokinetika tebainu .....	19
1.11 <i>N</i> -oxidy morfinanových alkaloidů .....	20
2 Cíl práce.....	21
3 Materiál a metody.....	22
3.1 Materiál .....	22
3.2 Přístroje .....	22

3.3	Software .....	22
3.4	Metody .....	23
3.4.1	Příprava vzorků .....	23
3.4.2	NMR spektroskopie .....	24
3.4.3	Optimalizace geometrie a výpočet NMR parametrů .....	24
4	Výsledky a diskuze .....	25
4.1	Výsledky NMR spektroskopie .....	27
4.2	Oxidace morfinu.....	32
4.3	Oxidace kodeinu.....	37
4.4	Oxidace tebainu.....	42
4.4.1	Oxidace tebainu: H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> při pokojové teplotě 1,5 měsíce.....	43
4.4.2	Oxidace tebainu: H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> při 60 °C jeden týden.....	46
5	Závěr.....	47
	Seznam použité literatury .....	48

## Seznam zkratek:

cAMP	cyklický adenosin monofosfát
NMR	nukleární magnetická resonance
UGT	UDP-glukuronosyltransferasa
CYP	cytochrom P450
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
COSY	z <i>angl.</i> correlation spectroscopy
ROESY	z <i>angl.</i> rotating frame nuclear Overhauser effect correlation spectroscopy
HSQC	z <i>angl.</i> heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy
HMBC	z <i>angl.</i> heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy
NOE	z <i>angl.</i> nuclear Overhauser effect
ppm	z <i>angl.</i> parts per million
DFT	z <i>angl.</i> density functional theory
MAE	z <i>angl.</i> mean absolute error
TMS	tetramethylsilan



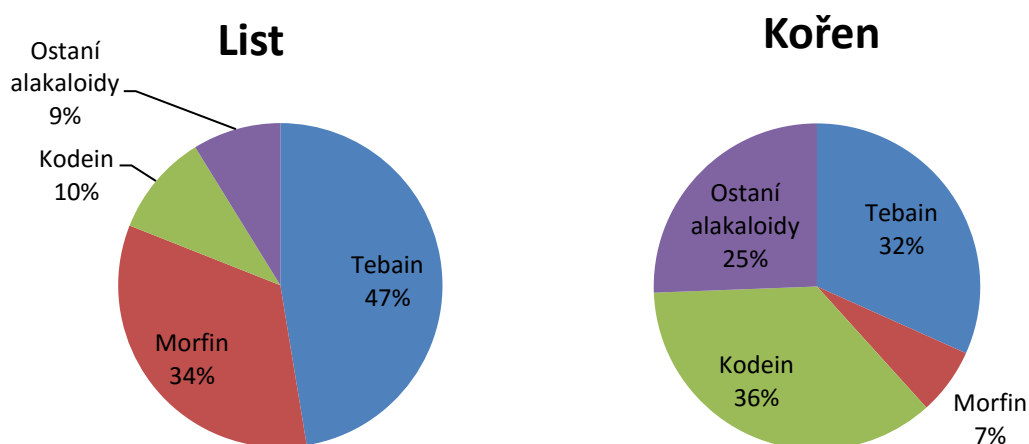
# 1 Teoretický úvod

## 1.1 Opiové alkaloidy

Opiové alkaloidy jsou obsaženy v cytoplazmě nebo latexu mléčnice máku setého (*Papaver somniferum*).<sup>1</sup> Mezi opiové alkaloidy patří celá řada látek, které mohou mít analgetické účinky například morfin, kodein a tebain, ale také látky bez analgetického účinku například papaverin a noskapin. Tato práce se detailně zabývá morfinem, kodeinem a tebainem, které tvoří podskupinu opiových alkaloidů nazývanou alkaloidy morfinanového typu.

## 1.2 Zastoupení alkaloidů v rostlině

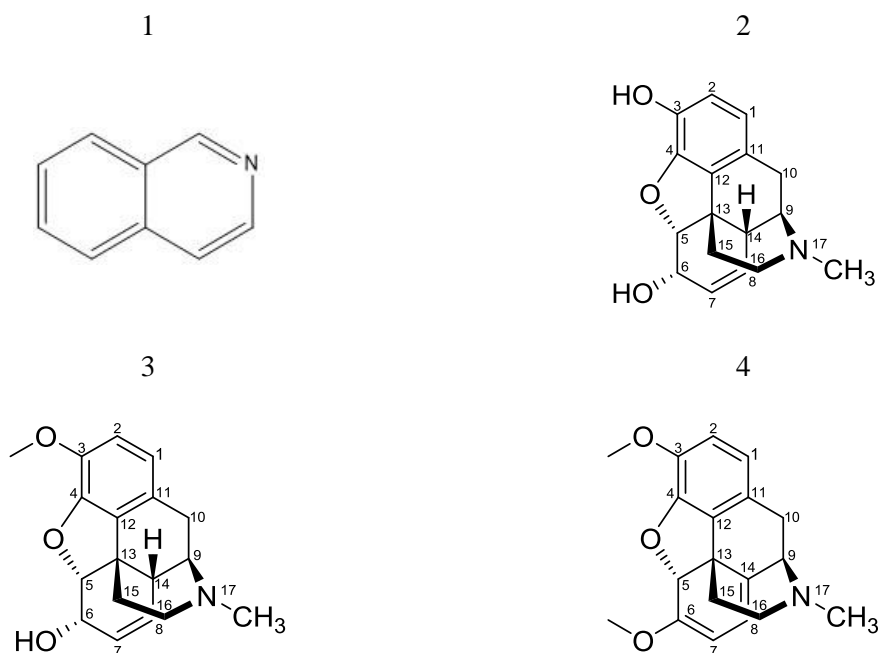
Obsahy opiových alkaloidů v latexu máku se liší nejen podle kultivarů máku, ale i podle různých částí rostlin.<sup>2</sup> Obrázek 1 ukazuje procentuální zastoupení alkaloidů v sušině latexu z máků pěstovaných pro farmaceutické účinky. Z grafu je patrné, že rozložení alkaloidů není v rostlině rovnoměrné. Lze si všimnout trendu obsahu morfinu, který je vysoký v listové části a naopak nízký v kořenové části, a obsahu kodeinu, který je zastoupen více v části kořenové. Příčinou je lokalizace enzymů, které katalyzují jednotlivé kroky biosyntézy (viz kapitola 1.3). Dále je v latexu obsažena voda, proteiny, tuky a minerální látky. U makovic pěstovaných pro jiné než farmaceutické účely se celkový obsah morfinanových alkaloidů snižuje na minimální hodnotu a převládají pouze alkaloidy bez analgetických účinků.<sup>2</sup>



**Obrázek 1:** Procentuální zastoupení alkaloidů sušiny latexu z různých částí rostlin.<sup>2</sup>

### 1.3 Struktura a vlastnosti

Alkaloidy jsou všeobecně skupina nízkomolekulárních, heterocyklických látek obsahujících dusík, jejichž syntéza začíná přeměnou aminokyselin.<sup>3</sup> Morfinanové alkaloidy patří mezi isochinolinové alkaloidy, jejichž základem je isochinolin (Obrázek 2).<sup>4</sup> Struktura morfinu, kodeinu i tebainu je velice podobná. Liší se methylovými skupinami na kyslíku v poloze 3 a 6 a dvojnou vazbou, která chybí u morfinu a kodeinu, čímž vzniká nové chirální centrum. Všechny tyto látky jsou bazické díky volnému elektronovému páru na dusíku terciárního aminu v poloze 17.



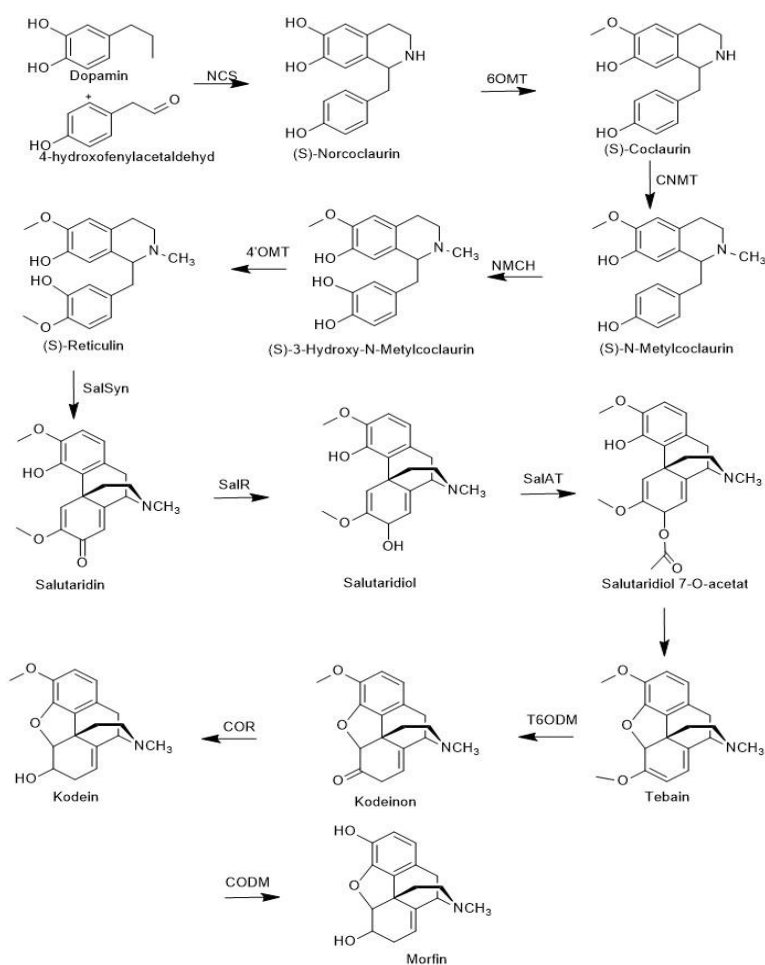
**Obrázek 2:** Struktura (1) isochinolinu, (2) morfinu, (3) kodeinu, (4) tebainu.<sup>5</sup>

Všechny tři alkaloidy jsou bílé krystalické látky, které se dobře rozpouští v methanolu. Přestože jsou všechny látky strukturou velice podobné, liší se mírou analgetického účinku. Jak již bylo řečeno, struktury morfinu, kodeinu a tebainu se liší substitucí v poloze 3 a 6. Důvodem rozdílných analgetických účinků jednotlivých alkaloidů jsou odlišné biotransformační reakce probíhající právě na skupinách přítomných na pozici 3 a 6.<sup>6</sup>

### 1.4 Biosyntéza morfinanových alkaloidů

Biosyntéza těchto alkaloidů je lokalizovaná ve dvou typech specializovaných buněk a to v mléčnici a sítkovici, a je v rostlině přísně regulována.<sup>7</sup> Celá syntéza vychází z L-tyrosinu<sup>2</sup>, který se nejprve přemění na dopamin.

Další kroky syntézy morfinanových alkaloidů z dopaminu jsou uvedeny na obrázku 3, kde jsou uvedeny i příslušné enzymy, jejichž výskyt rozhoduje o lokalizaci jednotlivých alkaloidů v různých částech rostliny. Převážná část biosyntézy probíhá v celé rostlině, některé enzymy však nejsou přítomné v některých orgánech rostliny. Enzym SalSyn (salutardinsyntasa) je obsažen hlavně ve stonku a pestíku a krok, který katalyzuje, neprobíhá v mléčnici. Dále enzym tebain 6-O-demethylasa (T6ODM) je obsažen převážně v kořenech a stonku a naopak enzym kodein-O-demethylasa (CODM) není obsažen v kořenech, ale pouze v listech a stonku.<sup>8</sup>



**Obrázek 3:** Syntéza morfinanových alkaloidů<sup>8</sup>. NCS (norcoclaurin syntasa); 6OMT (6-O-methyltransferasa); CNMT (6-coclaurin N-methyltransferasa); NMCH (N-methylcoclaurin 3-hydroxylasa); 4'OMT (3-hydroxy N-methylcoclaurin 4'-O-methyltransferasa); SalSyn (salutardinsyntasa); SalR (NADPH-dependentní salutaridinreduktasa); SalAT (acetyl-CoA-dependentní salutaridinol 7-O-acetyltransferasa); T6ODM (tebain 6-O-demethylasa); COR (NADPH-dependentní kodeinon reduktasa); CODM (kodein-O-demethylasa).

## 1.5 Příprava a využití morfinanových alkaloidů

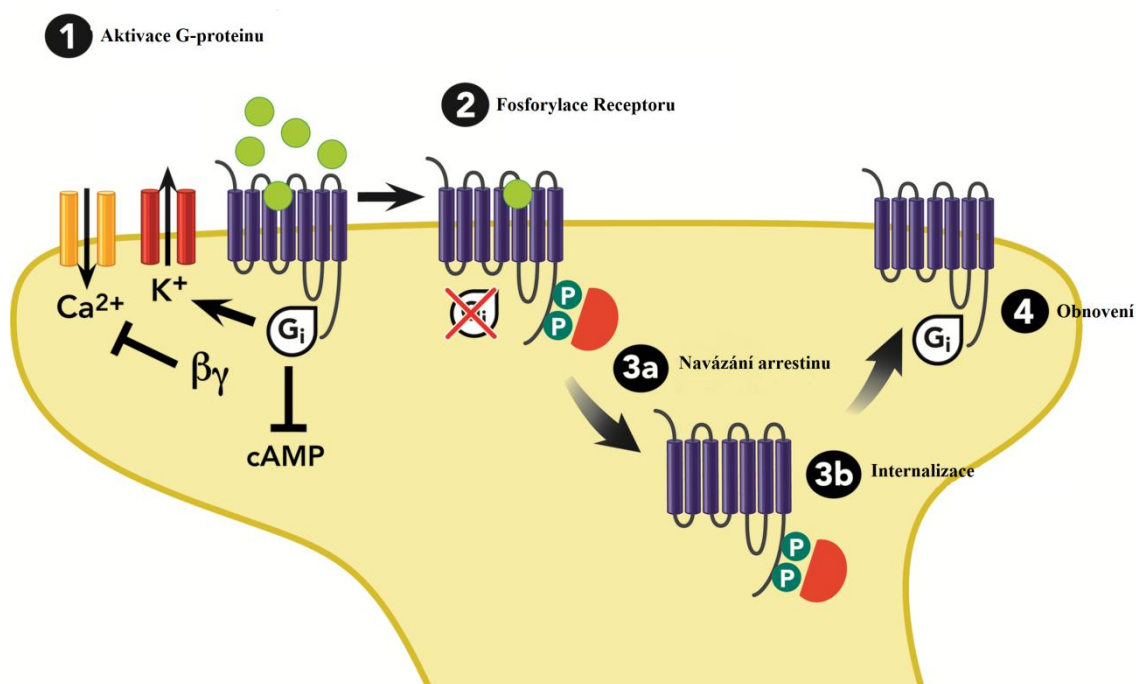
O používání opia jako léku jsou záznamy již ze staré antiky, morfin byl však izolován až v roce 1809, kodein a tebain o několik let později.<sup>9</sup> Morfin a kodein se využívají hlavně k potlačení chronických bolestí<sup>10</sup>, ale také například při léčbě akutního plicního edému nebo pro snížení symptomů akutní dušnosti.<sup>11</sup> Díky vysokým analgetickým účinkům jsou tyto alkaloidy zneužívány. Nejvíce je zneužíván morfin, který je hojně využíván v nemocnicích. Morfin se také používá na přípravu heroinu, což je 3,6-diacetylmorfin.<sup>12</sup>

Kvůli vysokému farmaceutickému využití - v roce 2000 byla celková celosvětová produkce opiových alkaloidů z máku 8700 tun<sup>13</sup> - jsou dnes morfinanové alkaloidy předmětem zkoumání organických chemiků i biochemiků. Díky tomu došlo v posledních letech k velkým pokrokům v jejich laboratorní přípravě.<sup>14</sup> Předmětem mnoha studií je syntéza biologicky aktivní derivátů, na které by nevznikala tak vysoká závislost.<sup>15</sup> Pro syntézu alkaloidů se dnes využívají i mikroorganismy, konkrétně fermentační systém *Escherichia coli*, které jsou schopné tyto alkaloidy produkovat.<sup>16</sup>

## 1.6 Farmakodynamika morfinanových alkaloidů

### 1.6.1 Opiové receptory

Existuje několik druhů opiových receptorů:  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\kappa$  a ORL<sub>1</sub>.<sup>17</sup> Tyto receptory jsou převážně lokalizované v mozku a v míše na membránových rozhraní dvou neuronů.<sup>18</sup> Jsou to transmembránové receptory spřažené s G proteiny.<sup>19</sup> Jsou přibližně z 60 % identické, mají celkem sedm transmembránových domén, liší se pouze délkou na C-konci a N-konci.<sup>20</sup> Patří do rodopsinové třídy. Jsou citlivé jak na endogenní, tak exogenní látky. Opiové receptory inhibují adenylátcyklázu, což je enzym, který katalyzuje syntézu cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP). Tyto receptory také inhibují kanály pro vápnaté ionty a aktivují kanály pro draselné ionty.<sup>21</sup> Na Obrázku 4 je souhrnná dráha signalizace těchto proteinů.



**Obrázek 4:** Schéma signalizace opiových receptorů. V kroku 1 dochází k navázání agonisty na receptor a aktivace G-proteinu, odpojení podjednotek  $G_i$ :  $G_\alpha$  a  $G_{\beta\gamma}$ , inhibice cAMP a  $Ca^{2+}$  kanálů a aktivace  $K^+$  kanálů. V kroku 2 dochází k fosforylaci receptoru. V kroku 3a a 3b dochází k navázání arrestinu a internalizaci a v posledním 4 kroku k obnovení receptoru. Převzato a upraveno z literatury [cit.<sup>22</sup>].

Jednotlivé typy receptorů a jejich specifické odezvy na morfinanové alkaloidy jsou uvedeny níže:

### **$\mu$ -receptory:**

Tyto receptory jsou rozděleny do tří podtypů  $\mu_1$ ,  $\mu_2$  a  $\mu_3$ .<sup>23</sup> Mají největší afinitu k morfinanovým alkaloidům, proto hrají největší roli ve funkci těchto alkaloidů.<sup>24</sup> Aktivace receptorů  $\mu_1$  nejvíce přispívá k analgetickým účinkům těchto alkaloidů.<sup>25</sup> Receptory  $\mu_2$  se pravděpodobně nachází v hladké svalovině tenkého střeva, kde po jejich navázání s agonistou dochází k aktivaci kanálů draselných iontů, následně dojde k hyperpolarizaci buněčné membrány a k relaxaci hladké svaloviny. U člověka tedy může dojít ke konstipaci.<sup>26</sup> Receptory  $\mu_3$  se nacházejí v endotelových buňkách a jejich aktivace je spojována s produkcí oxidu dusnatého a může vyvolat vazodilataci.<sup>27</sup>

### **$\delta$ -receptory:**

Tyto receptory jsou převážně aktivovány enkefaliny<sup>24</sup>, což jsou endogenní pentapeptidy.<sup>28</sup> Nicméně i tyto receptory přispívají k analgetickému účinku morfinanových alkaloidů.<sup>29</sup> Vazbou alkaloidů na  $\mu$ -receptory dojde k vypuštění enkefalinů a následné aktivaci  $\delta$ -receptorů.<sup>30</sup> Navíc aktivitu těchto receptorů zvyšují některé metabolity morfinanových alkaloidů a tím také přispívají ke zvýšení analgetického účinku.<sup>31</sup>

### **$\kappa$ -receptory:**

Hlavním ligandem tohoto receptoru jsou dynorfiny,<sup>32</sup> což je skupina proteinů, která má analgetické účinky a je reakcí organismu na bolest.<sup>33</sup> Navázáním dynorfinů na tyto receptory může mít za následek i chronický stres organismu nebo zhoršení nálady.<sup>34</sup> Po chronickém užívání morfinanových alkaloidů dochází po jejich vysazení k zvýšené tvorbě dynorfinů. Proto je jeden z abstinčních příznaků zhoršená nálada a stres. Z tohoto důvodu je dnes předmětem studie vytvoření antagonistů těchto receptorů pro zmírnění abstinčních příznaků.<sup>35</sup>

### **ORL<sub>1</sub>-receptory:**

Hlavními agonisty těchto receptorů jsou nociceptiny, což je endogenní protein s analgetickými účinky. Tyto receptory mají jenom malou afinitu k morfinanovým alkaloidům, proto jejich příspěvek k účinkům má spíše sekundární charakter.<sup>36</sup> Studie ukazují, že aktivací nebo inaktivací těchto receptorů dochází ke změně analgetických účinků morfinanových alkaloidů. Tento fakt je předmětem studií zabývajících se možností využití těchto receptorů pro zvýšení terapeutického účinku morfinu při léčbě chronické bolesti.<sup>37</sup>

### 1.6.2 Vliv morfinanových alkaloidů na genovou expresi

Ovlivnění genové exprese bylo zkoumáno především u morfinu. Morfin může ovlivnit genovou expresi nejen při chronickém používání, ale už i při jednom užití. Všechny tyto změny byly zkoumány hlavně v mozku a prodloužené míše. Při jednorázové aplikaci ovlivňuje expresi proteinů podílejících se na mitochondriální respiraci a expresi cytoskeletálních proteinů.<sup>38</sup> Ovlivnění exprese respiračních proteinů probíhá nepřímo. Morfin se váže na opiové receptory, které pomocí G proteinů sníží koncentraci cAMP a  $\text{Ca}^{2+}$  iontů, což inhibuje transkripci genu. Tato inhibice není dosud zcela objasněna a je předmětem studia. Morfin způsobuje snížení exprese některých podjednotek komplexu I, NADH-ubichinon-oxidoreduktasy, což je první enzym mitochondriálního elektronového transportního řetězce. Dále také morfin snižuje exprese  $\gamma$ -aktinu.<sup>38</sup>

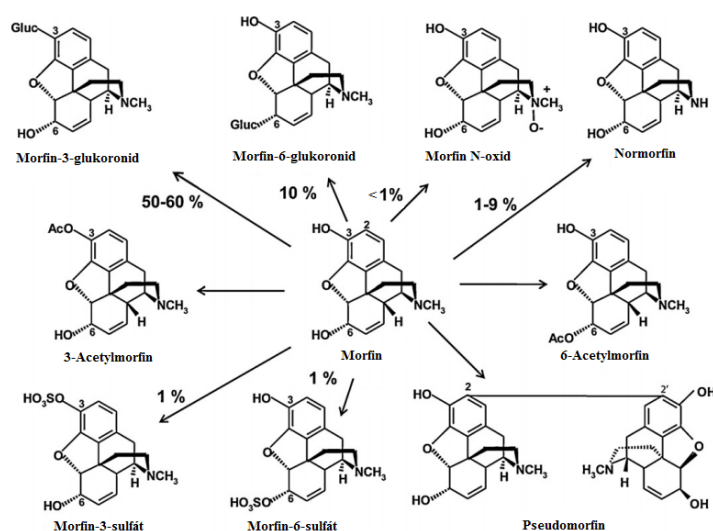
Při dlouhodobém užívání morfinu dochází ke zvýšení exprese proteinů tepelného šoku,<sup>39</sup> což jsou proteiny, které hrají velkou roli při udržování stability jiných proteinů v buňce a slouží jako univerzální stresová odpověď.<sup>40</sup> Tato změna probíhá pouze tehdy, dokud je organismus vystaven morfinanovým alkaloidům. Některé změny v genové expresi ale zůstávají ovlivněny trvale i po vysazení alkaloidů. Jedná se o exprese proteinů regulujících cirkadiánní rytmy, transkripčních faktorů a proteinů podílejících se na synaptickém spojení neuronů.<sup>41</sup> Předpokládá se, že závislost na morfinanových alkaloidech vzniká změnou synaptických spojení neuronů, která přetrvává dlouhodobě i po jejich vysazení.<sup>42</sup>

## 1.7 Farmakokinetika morfianových alkaloidů

Metabolismus alkaloidů probíhá převážně v játrech. Nedávné studie však dokazují, že nezanedbatelná část jejich transformace probíhá i v ledvinách.<sup>43</sup> Celková rychlost metabolismu je určena mnoha faktory, jako jsou genetická výbava, věk, pohlaví, životní styl, ale i životní prostředí.<sup>44</sup> Celý metabolismus pak probíhá ve dvou hlavních fázích, jako u většiny léčiv. V 1. fázi biotransformace dochází například k oxidaci, nebo redukci látek. V této fázi probíhá i oxidace na dusíku a vytváření *N*-oxidů. V druhé fázi jsou látky konjugovány například s kyselinou glukuronovou, glutathionem nebo sulfátem, aby vytvořily hydrofilní látky, které jsou lépe rozpustné ve vodě a lépe se vylučují z organismu.

## 1.8 Farmakokinetika morfinu

Na Obrázku 5 jsou uvedeny hlavní produkty metabolismu morfinu. U některých metabolitů je uvedeno kolik procent morfinu se přemění na daný metabolit. Ostatní metabolity byly pouze detekovány a není určeno jejich přesné zastoupení. Jednotlivé procentuální zastoupení metabolitů se může mírně lišit, záleží totiž na způsobu podání morfinu,<sup>46</sup> nebo zda je podáván akutně, či chronicky.<sup>47</sup> Dále budou podrobněji specifikovány hlavní tři metabolity: morfin-3-glukuronid, morfin-6-glukuronid a normorfin a vedlejší metabolity morfin 3- a 6-sulfát a morfin *N*-oxid.



**Obrázek 5:** Jednotlivé metabolické přeměny morfinu. Převzato a upraveno z literatury [cit.<sup>45</sup>].



### 1.8.1 Morfin-3-glukuronid a morfin-6-glukuronid

Oba tyto metabolity jsou konjugovány s kyselinou glukuronovou<sup>48</sup> na kyslíku v poloze 3 nebo v poloze 6. Morfin-3-glukuronid je procentuálně nejhojnější produkt metabolismu morfinu (50 - 60 %). Má velice nízkou afinitu k opiovým receptorům a nemá žádný analgetický potenciál.<sup>49</sup> Naopak morfin-6-glukuronid, který je druhým nejhojnějším produktem (okolo 10 %), se na analgetickém účinku morfinu významně podílí.<sup>50</sup> Tento metabolit vykazuje podobné analgetické účinky, při podkožním podání dokonce čtyřikrát větší účinky, než morfin.<sup>51</sup> Analgetický účinek je hlavně zprostředkovaný vazbou na  $\mu_1$  receptory, ke kterým má vyšší afinitu než morfin, naopak k  $\mu_2$  receptorům je jeho afinita nižší.<sup>52</sup> U lidí s normální funkcí ledvin vykazuje méně negativních účinků, naopak u lidí se zhoršenou funkcí ledvin vyvolává mnoho nežádoucích účinků.<sup>53</sup>

Metabolismus morfinu na tyto metabolity probíhá v endoplazmatickém retikulu jaterních buněk<sup>54</sup> a tvorba obou látek je katalyzována stejným enzymem UDP glukuronidtransferasou (UGT), specifitěji UGT2B7 a UGT1A3.<sup>55</sup> Následně jsou tyto látky distribuovány ven z jater do ledvin, odkud jsou odváděny močí z organismu.<sup>56</sup> Tyto metabolity jsou díky tvaru molekuly lipofilnější, než by se předpokládalo, a proto snadněji prostupují hematoencefalitickou membránou,<sup>57</sup> což je bariéra, která omezuje transport látek mezi cévním systémem a mozkem.<sup>58</sup> To je i jedna z příčin, proč má morfin-6-glukuronid tak vysoký analgetický účinek.

### 1.8.2 Normorfin

Tento metabolit je produktem *N*-demethylace na dusíku v poloze 17. Zastoupení tohoto metabolitu se pohybuje od 1 – 9 %, a je dáno způsobem podání morfinu. Nejvyšší zastoupení má při orálním požití.<sup>59</sup> Tento metabolit prokazuje nízké analgetické účinky<sup>60</sup> a při vysokých dávkách morfinu se předpokládá, že přispívá k neurotoickým účinkům.<sup>61</sup>

*N*-demethylace je zprostředkována cytochromy P450 (CYP), přesněji CYP3A4 a CYP2C8 a probíhá také převážně v játrech, odkud je tento metabolit následně přes ledviny vyloučen močí.<sup>62</sup>

### 1.8.3 Morfin-3-sulfát a morfin-6-sulfát

Tyto metabolity vznikají navázáním sulfátové skupiny na kyslík v poloze 3 nebo 6. Zastoupení těchto metabolitů je okolo 1 – 2 %. Tyto metabolity jsou zastoupeny hlavně u novorozeňat, protože sulfatace je jedna z hlavních drah detoxikace organismu u plodů,<sup>63</sup> a u lidí trpících rakovinou.<sup>64</sup> Analgetické účinky jsou podobné jako u konjugace s glukuronovou kyselinou, pouze metabolit se sulfátem v poloze 6 jeví známky analgetických účinků, které jsou srovnatelné s morfinem, metabolit se sulfátem v poloze 3 nejvíce téměř žádné analgetické účinky. Nicméně sulfátová skupina je polární a kyselá a proto tyto metabolity nepronikají tak snadno přes hematoencefalitickou membránu jako konjugáty s kyselinou glukuronovou.<sup>65</sup>

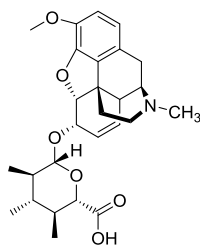
Metabolická přeměna na tyto metabolity probíhá v buněčném cytosolu hlavně v játrech, ale i v ledvinách a tenkém střevě. Hlavní enzym podílející se na této přeměně je sulfotransferasa 1A1.<sup>64</sup>

## 1.9 Farmakokinetika kodeinu

Přeměna kodeinu probíhá stejně jako u morfinu hlavně v játrech, i když některé metabolické cesty přeměny kodeinu byly nalezeny i v mozku a ve střevech.<sup>66</sup> Hlavní metabolity kodeinu jsou kodein-6-glukuronid, dále norkodein, který se dále přeměňuje na norkodein-6-glukuronid, a jistá část kodeinu se přemění na morfin. Mezi vedlejší metabolity kodeinu patří hydrokodon, nebo kodein *N*-oxid.<sup>67</sup>

### 1.9.1 Kodein-6-glukuronid

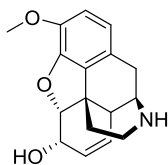
Metabolit kodeinu, který je na obrázku 6, má v poloze 6 na kyslíku navázán kyselinu glukuronovou. Zastoupení tohoto metabolitu je okolo 50 – 70 %. Tento metabolit vzniká v játrech, stejně jako morfin 3- a 6-glukuronid, hlavně pomocí enzymu UGT2B7.<sup>54</sup> Analgetická aktivita a jeho afinita k opiovým receptorům u kodeinu-6-glukuronidu je skoro stejná jako u samotného kodeinu.



**Obrázek 6:** Struktura kodeinu-6-glukuronidu.

### 1.9.2 Norkodein

Norkodein je produktem demethylace na dusíku v poloze 17, struktura tohoto metabolitu je vyobrazena na obrázku 7. Zastoupení tohoto metabolitu je okolo 10 – 20 %.<sup>68</sup> N-demethylace je zprostředkována stejně jako u normorfinu pomocí cytochromu P450 (CYP), přesněji CYP3A4 a CYP2C8, a probíhá také převážně v játrech, odkud se dále přes ledviny vylučuje močí.



**Obrázek 7:** Struktura norkodeinu.

## 1.10 Farmakokinetika tebainu

Tebain je z těchto alkaloidů nejméně významný, protože nemá žádný analgetický efekt. Proto jsou jeho metabolické dráhy nejméně popsány. Jeden z důvodů, proč má tebain tak nízký analgetický účinek je, že má methylované kyslíky v poloze 3 a 6, proto na těchto místech neprobíhají stejné metabolické přeměny, jako u morfinu a kodeinu. Jeho hlavní dva metabolity jsou oripavin, což je demethylovaný tebain v poloze 3 na kyslíku, tato látka má podobné analgetické účinky jako morfin, ale není klinicky využívána.<sup>69</sup> Dalším metabolitem je kodeinon, který má keto skupinu na uhlíku v poloze 6.<sup>70</sup> Jelikož samotný tebain nemá velký farmaceutický význam, nebudou jeho metabolity dále detailně popisovány.

## 1.11 *N*-oxidy morfinanových alkaloidů

*N*-oxidy jsou pro tělo běžné produkty metabolismu jak xenobiotik, tak endogenních látek. Oxidace probíhá enzymaticky v játrech a je součástí elektronového transportního řetězce. Hlavními enzymy této přeměny jsou cytochrom P-450 a NADPH:cytochrom P450 reduktasa.<sup>71</sup> *N*-oxidy nevznikají jen jako produkt metabolismu morfinanových alkaloidů, ale byly izolovány i z máku setého.<sup>72</sup>

Oxidace morfinanových alkaloidů probíhá na dusíku poloze 17, kde se po této oxidaci vytvoří nové chirální centrum. *N*-oxidy jako metabolity jsou pouze minoritními produkty a vzniká jich méně jak 1%. Toto množství je detekovatelné v moči pouze tehdy, pokud je s alkaloidem podáván také takrin, který inhibuje enzymy, čímž brání další přeměně těchto *N*-oxidů.<sup>73</sup>

Morfin *N*-oxid je další z metabolitů, který má analgetický účinek. Míra analgetického účinku je dána způsobem podání. Při podkožním podání má 11-22 krát menší aktivitu a při intraperitoneálním má 39-89 krát menší aktivitu než morfin. Důvodem nižší aktivity je skutečnost, že morfin *N*-oxid je v játrech rychle odbouráván.<sup>74</sup> Jedním z možných produktů odbourávání v játrech může být normorfin.<sup>75</sup>

*N*-oxidy morfinanových alkaloidů jsou pouze minoritními metabolity, ale díky jejich analgetickému účinku, nemohou být zanedbány. Jejich struktura není díky vzniku nového chirálního centra na dusíku v poloze 17 zjevná. Teoreticky mohou vznikat dva diastereoizomerní oxidy lišící se právě konfigurací na tomto dusíku. Praktická část této bakalářské práce se tedy zabývá studiem konfigurace *N*-oxidů vzniklých oxidací morfinu, kodeinu a thebainu pomocí NMR spektroskopie a molekulového modelování.

## 2 Cíl práce

Jedním z cílů této práce je vypracovat rešerši o dosavadních poznatcích o morfinanových alkaloidech, zahrnující informace o jejich biosyntéze, metabolismu v organismu a fyziologických účincích.

Druhá část práce se zabývá jedním z možných metabolitů morfinanových alkaloidů, a to jejich *N*-oxidů. Tyto metabolity morfinanových alkaloidů mohou existovat jako dva diastereoizomery lišící se konfigurací na asymetrickém dusíkovém atomu. Cílem praktické části práce bylo zejména:

- Studium diastereoselektivity *in situ* oxidace morfinanových alkaloidů a stanovení konfigurace vzniklých *N*-oxidů pomocí experimentální NMR spektroskopie
- Vývoj alternativní metody stanovení konfigurace morfinanových *N*-oxidů zahrnující porovnání teoreticky předpovězených  $^{13}\text{C}$  chemických posunů s experimentálními

## 3 Materiál a metody

### 3.1 Materiál

Morfinanové alkaloidy (morfin fosfát, kodein a tebain) byly získány ze sbírky alkaloidů Dr. Miloše Buděšínského z NMR laboratoře ÚOCHB AV ČR. Morfin fosfát byl převeden na volnou bázi rozpuštěním ve vodě, alkalizací pomocí  $K_2CO_3$  a extrakcí do chloroformu.

deuterovaný chloroform ( $CDCl_3$ ) (99,8 % D, Isochem)

deuterovaný methanol ( $CD_3OD$ ) (99,8 % D, Sigma-Aldrich).

*m*-chlorperoxybenzoová kyselina (Sigma-Aldrich)

30% roztok  $H_2O_2$  ve vodě (Penta s.r.o.).

### 3.2 Přístroje

#### NMR spektrometry:

NMR spektrometr Bruker Avance 600 III HD vybavený 5 mm TCI kryosondou (Bruker)

NMR spektrometr Bruker Avance 500 III HD vybavený 5 mm BBO kryosondou (Bruker)

### 3.3 Software

#### NMR měření a analýza spekter

TopSpin<sup>TM</sup> (Bruker); MNova NMR (Mestrelab Research)

#### Kvantově chemické výpočty

Gaussian 09 revision D.01 (Gaussian, Inc.); GaussView 3.09 (Gaussian, Inc.); HyperChem

Professional 8.0 (Hypercube, Inc.)

### 3.4 Metody

#### 3.4.1 Příprava vzorků

Pro měření NMR spekter byly morfinanové alkaloidy rozpuštěny v 600  $\mu$ l chloroformu ( $\text{CDCl}_3$ ), nebo  $\text{CD}_3\text{OD}$  v NMR kyvetě. Všechny oxidace byly prováděny *in situ* v NMR kyvetě. V případě  $\text{CDCl}_3$  roztoků byla jako oxidační činidlo použita kyselina *m*-chlorperoxybenzoová (1,2 ekvivalentu) a oxidace probíhala za laboratorní teploty. V případě roztoků  $\text{CD}_3\text{OD}$  byla oxidace prováděna pomocí peroxidu vodíku (1,2 ekvivalentu) při laboratorní teplotě nebo při teplotě 60 °C.

##### **Tebain:**

Vzorek tebainu byl připraven tak, že bylo naváženo 8,2 mg a kvantitativně převedeno do NMR kyvety a rozpuštěno v  $\text{CD}_3\text{OD}$  (42 mM roztok). Po změření NMR spekter byl do roztoku přidán peroxid vodíku (3,58 mg 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Průběh oxidace byl sledován NMR a měřen hned po přidání peroxidu vodíku a následně druhý den. Bylo zjištěno, že oxidace neprobíhá. Proto bylo k vzorku přidáno ještě 10 molárních ekvivalentů peroxidu vodíku (29 mg 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), celkem tedy 11,2 molárních ekvivalentů. Protože k oxidaci ani přesto nedošlo, byl vzorek ponechán jeden týden při 60 °C a v průběhu analyzován pomocí NMR. Následně byl připraven druhý vzorek tebainu, ke kterému bylo přidáno pouze 1,2 ekvivalentu peroxidu vodíku (3,58 mg 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) a vzorek byl ponechán při pokojové teplotě 1,5 měsíce. Poté byla změřena NMR spektra. Další vzorek byl připravený rozpuštěním 8 mg tebainu  $\text{CDCl}_3$  (43mM roztok) v NMR kyvetě. Následně byla měřena NMR spektra. Po změření byl tento vzorek oxidován 5,22 mg (31 mmol) kyseliny *m*-chlorperoxybenzoové a následně byla měřena NMR spektra.

##### **Kodein:**

Vzorek kodeinu byl připraven tak, že bylo naváženo 5 mg kodeinu a toto množství bylo kvantitativně převedeno do NMR kyvety, kde byl rozpuštěn v  $\text{CD}_3\text{OD}$  (27 mM roztok). Následně byla změřena NMR spektra. Po změření NMR spekter, proběhla oxidace kodeinu přidáním peroxidu vodíku (2,27 mg 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) k původnímu vzorku. Oxidace kodeinu probíhala pomalu, proto byl roztok nechán při teplotě 60 °C osm dní.

##### **Morfin:**

V případě morfinu byly naváženy 4 mg, kvantitativně převedeny do NMR kyvety a následně rozpuštěny v  $\text{CD}_3\text{OD}$  (23 mM roztok). Po změření NMR spekter byl tento vzorek



oxidován peroxidem vodíku (2,30 mg 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) a následně byla reakční směs ponechána při 60 °C osm dní, aby proběhla oxidace kompletně. Poté byla měřena NMR spektra.

### 3.4.2 NMR spektroskopie

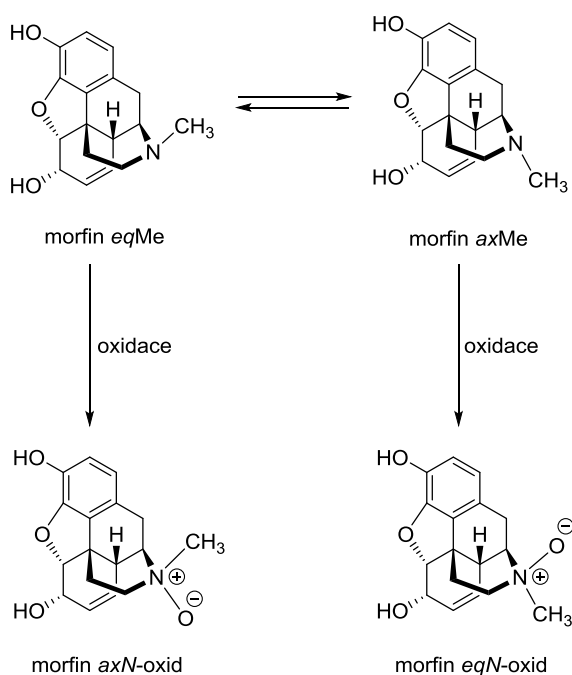
NMR spektra byla měřena na spektrometrech Bruker Avance 600 HDIII ( $^1\text{H}$  při 600,1 MHz,  $^{13}\text{C}$  při 150,9 MHz) nebo Bruker Avance 500 HDIII ( $^1\text{H}$  při 500,0 MHz,  $^{13}\text{C}$  při 125,7 MHz). Vzorky byly rozpuštěny v  $\text{CDCl}_3$  nebo v  $\text{CD}_3\text{OD}$ . Chemické posuny (v ppm,  $\delta$  stupnice) byly vztaženy v  $^1\text{H}$  NMR spektrech ke zbytkovému signálu rozpouštědla ( $\delta(\text{CDCl}_3) = 7,26$  ppm,  $\delta(\text{CHD}_2\text{OD}) = 3,31$  ppm), v  $^{13}\text{C}$  NMR spektrech k signálu rozpouštědla ( $\delta(\text{CDCl}_3) = 77,0$  ppm,  $\delta(\text{CD}_3\text{OD}) = 49$  ppm). Úplné přiřazení signálů bylo provedeno na základě analýzy korelovaných homonukleárních  $\text{H,H-COSY}$ ,  $\text{H,H-ROESY}$  a heteronukleárních  $\text{H,C-HSQC}$ ,  $\text{H,C-HMBC}$  a  $\text{H,N-HMBC}$  spekter.

### 3.4.3 Optimalizace geometrie a výpočet NMR parametrů

Nejprve byly v programu HyperChem vytvořeny struktury dvou konformerů všech výchozích morfinanových alkaloidů a jejich *N*-oxidů. V programu Gaussian byly všechny struktury optimalizovány. Na optimalizaci byla zvolená metoda DFT (density functional theory). Následně byly optimalizované struktury všech látek použity pro výpočty jejich NMR parametrů, které byly prováděné stejnou metodou DFT. Součástí této metody je i výpis součtu termálních a elektronových energií. Tato hodnota vypovídá o stabilitě molekuly. Čím nižší je tato hodnota, tím by měla být struktura stabilnější

## 4 Výsledky a diskuze

Oxidace morfinanových alkaloidů může teoreticky poskytovat dva diastereoizomerní *N*-oxidy lišící se konfigurací na asymetrickém dusíku. Poměr těchto diastereoizomerů bude řízen kineticky, protože po oxidaci již nedochází k přeměně jednoho diastereoizomeru na druhý. Dá se tedy předpokládat, že diastereoselektivita oxidace bude řízena snadnějším přístupem oxidačního činidla k dusíku jako místu oxidace. Nejprve byly tedy prozkoumány možné konformery výchozích alkaloidů. Geometrie morfinanových alkaloidů je rigidní, pouze na atomu dusíku může docházet ke změně orientace methyly z axiální do ekvatoriální polohy a zpět (Obrázek 8). Zastoupení těchto dvou konformerů je dáno hodnotou volné Gibbsovy energie a s největší pravděpodobností také řídí stereoselektivitu oxidace.



**Obrázek 8:** Rovnováha mezi morfinem s methylem v ekvatoriální poloze (eqMe) a morfinem s methylem v axiální poloze (axMe) a jejich následná oxidace na morfin *N*-oxid s kyslíkem v axiální poloze (axN-oxid) a morfin *N*-oxid s kyslíkem v ekvatoriální poloze (eqN-oxid).

Nejprve byly tedy optimalizovány geometrie jednotlivých konformerů výchozích alkaloidů a určen jejich rovnovážný poměr v roztoku. Pro optimalizaci byl použit program Gaussian a geometrie byly optimalizovány pomocí DFT metody B3LYP/6-31G\*. Stejným způsobem byly optimalizovány geometrie vzniklých *N*-oxidů, u kterých byla navíc vypočítána  $^{13}\text{C}$  stínící konstanta ( $\sigma$ ) pro jednotlivá  $^{13}\text{C}$  jádra. Z těchto stínících konstant byl

pak vypočten teoretický  $^{13}\text{C}$  chemický posun ( $\delta$ ) jako rozdíl stínící konstanty standardu (tetramethylsilan -TMS) vypočtené stejnou metodou a stínící konstanty zkoumaného  $^{13}\text{C}$  jádra. Tento vypočtený chemický posun byl pak použit při porovnání s experimentální hodnotou. Kromě absolutní hodnoty chemického posunu byl také porovnáván rozdíl chemických posunů  $^{13}\text{C}$  jádra po oxidaci a před oxidací ( $\Delta\delta$ ). Tato hodnota nevyžaduje vztahování na tetramethylsilan a je tedy zatížena menší chybou.

Při experimentálním studiu diastereoselektivity oxidace morfinanových alkaloidů byla nejprve naměřena NMR data ( $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  chemické posuny,  $J(\text{H,H})$  a NOE) pro jednotlivé výchozí alkaloidy. Přiřazení všech  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR signálů bylo provedeno na základě analýzy 1D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -APT) a 2D spekter (H,H-COSY, H,H-ROESY, H,C-HSQC a H,C-HMBC). Vlastní oxidace probíhala *in situ* v NMR kyvetě, tj. bez nutnosti izolace vzniklých *N*-oxidů. V případě  $\text{CDCl}_3$  roztoků byla jako oxidační činidlo použita *m*-chlorperoxybenzoová kyselina a oxidace probíhala za laboratorní teploty. Tato metoda poskytuje *N*-oxidy ihned, má však některá úskalí: a) rozpustnost kodeinu a morfinu v  $\text{CDCl}_3$  je nízká; b) vzniklé *N*-oxidy jsou v kyselém prostředí protonované a chemické posuny *N*-oxidů jsou touto protonací ovlivněny. Byla proto zvolena alternativní metoda zahrnující rozpuštění výchozích alkaloidů v  $\text{CD}_3\text{OD}$  a následnou oxidaci pomocí 30% vodného  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Rychlost této oxidace byla výrazně pomalejší a úplná přeměna výchozího alkaloidu při použití 1,2 ekvivalentu  $\text{H}_2\text{O}_2$  trvala při laboratorní teplotě několik týdnů. Rychlost reakce je možné zvýšit vyšší reakční teplotou ( $60\text{ }^\circ\text{C}$ ), avšak při této teplotě může docházet k rozkladu některých produktů (viz oxidace tebainu).

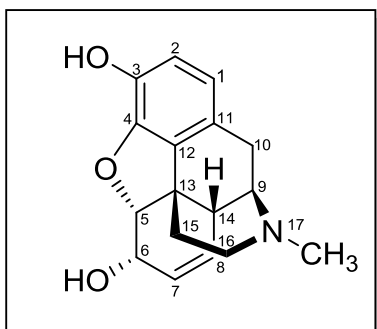
Struktura vzniklých *N*-oxidů byla dále analyzována pomocí NMR spektroskopie. Úplné přiřazení signálů bylo provedeno stejně jako v případě výchozích alkaloidů. Klíčovou roli při stanovení konfigurace vzniklých *N*-oxidů sehrálo H,H-ROESY spektrum, které poskytuje informaci o prostorové blízkosti vodíkových jader prostřednictvím NOE. Podrobná diskuze pro jednotlivé alkaloidy je uvedena dále.

## 4.1 Výsledky NMR spektroskopie

Pro přehlednost jsou zde uvedeny naměřené hodnoty NMR parametrů jednotlivých látek. U každé látky je uvedena struktura s číslováním atomů, které odpovídá přiřazení. Použité zkratky  $^1\text{H}$  signálů: d-dublet, dd-dublet dubletů, ddd-dublet dubletů dubletů, dddd-dublet dubletů dubletů dubletů, t-triplet, tt-triplet tripletů, dt-dublet tripletů, ddt- dublet dubletů tripletů.

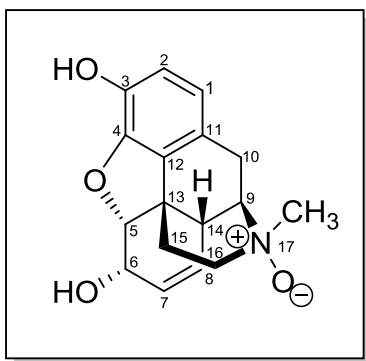
NMR spektroskopie:

### Morfin:



$^1\text{H}$  NMR (500,0 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 1,82 (ddd, 1H,  $J_{\text{gem}} = 12,8$ ,  $J_{15b,16} = 3,6$ , 1,7, H-15b); 2,09 (td, 1H,  $J_{\text{gem}} = 12,8$ ,  $J_{15a,16} = 12,8$ , 5,1, H-15a); 2,36 (ddd, 1H,  $J_{\text{gem}} = 18,8$ ,  $J_{10b,9} = 6,4$ ,  $J_{10b,1} = 0,9$ , H-10b); 2,45 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{N-17}$ ); 2,46 (ddd, 1H,  $J_{16b,15} = 12,8$ , 3,6,  $J_{\text{gem}} = 12,3$ , H-16b); 2,62 (dddd, 1H,  $J_{\text{gem}} = 12,3$ ,  $J_{16a,15} = 5,1$ , 1,7,  $J_{16a,9} = 0,9$ , H-16a); 2,66 (tt, 1H,  $J_{14,9} = J_{14,7} = 3,2$ ,  $J_{14,6} = J_{14,8} = 2,0$ , H-14); 3,04 (d, 1H,  $J_{\text{gem}} = 18,8$ , H-10a); 3,40 (dd, 1H,  $J_{9,10b} = 6,2$ ,  $J_{9,14} = 3,2$ , H-9); 4,19 (ddt, 1H,  $J_{6,5} = 6,3$ ,  $J_{6,8} = 3,4$ ,  $J_{6,7} = J_{6,14} = 2,0$ , H-6); 4,81 (dd, 1H,  $J_{5,6} = 6,3$ ,  $J_{5,7} = 1,3$ , H-5); 5,32 (ddd, 1H,  $J_{8,7} = 9,9$ ,  $J_{8,6} = 3,4$ ,  $J_{8,14} = 2,0$ , H-8); 5,63 (dddd, 1H,  $J_{7,8} = 9,9$ ,  $J_{7,14} = 3,2$ ,  $J_{7,6} = 2,0$ ,  $J_{7,5} = 1,3$ , H-7); 6,45 (dt, 1H,  $J_{1,2} = 8,1$ ,  $J_{1,10} = 0,9$ , H-1); 6,53 (d, 1H,  $J_{2,1} = 8,1$ , H-2).  $^{13}\text{C}$  NMR (125,7 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 21,60 ( $\text{CH}_2$ -10); 36,31 ( $\text{CH}_2$ -15); 41,51 (CH-14); 43,06 ( $\text{CH}_3$ -17); 44,41 (C-13); 47,48 ( $\text{CH}_2$ -16); 60,24 (CH-9); 67,97 (CH-6); 92,93 (CH-5); 117,85 (CH-2); 120,51 (CH-1); 127,11 (C-11); 129,47 (CH-8); 131,99 (C-12); 133,93 (CH-7); 139,79 (C-3); 147,40 (C-4).

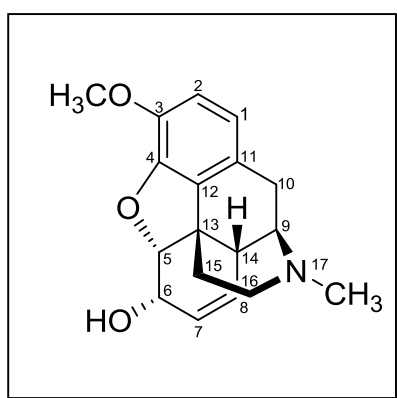
### Morfin N-oxid:



$^1\text{H}$  NMR (500,0 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 1,83 (ddd, 1H,  $J_{\text{gem}} = 13,5$ ,  $J_{15b,16} = 3,8$ , 1,7, H-15b); 2,69 (ddd, 1H,  $J_{\text{gem}} = 13,5$ ,  $J_{15a,16} = 12,8$ , 4,7, H-15a); 2,92 (ddd, 1H,  $J_{\text{gem}} = 20,2$ ,  $J_{10b,9} = 6,7$ ,  $J_{10b,1} = 0,9$ , H-10b); 3,20 (ddt, 1H,  $J_{\text{gem}} = 12,8$ ,  $J_{16b,15} = 4,6$ , 1,7,  $J_{16b,9} = 1,7$ , H-16b); 3,28 (dd, 1H,  $J_{\text{gem}} = 20,2$ ,  $J_{10a,1} = 0,9$ , H-10a); 3,37 (td, 1H,  $J_{\text{gem}} = 12,8$ ,  $J_{16a,15} = 12,8$ , 3,8, H-16a); 3,37 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{N-17}$ ); 3,82 (ddd, 1H,  $J_{9,10b} = 6,7$ ,

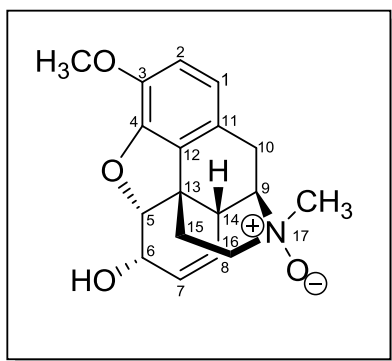
$J_{9,14} = 3,6$ ,  $J_{9,16b} = 1,7$ , H-9); 3,94 (dtd, 1H,  $J_{14,9} = 3,6$ ,  $J_{14,6} = J_{14,7} = 3,2$ ,  $J_{14,8} = 2,3$ , H-14); 4,25 (dtd, 1H,  $J_{6,5} = 6,3$ ,  $J_{6,8} = J_{6,14} = 3,2$ ,  $J_{6,7} = 2,1$ , H-6); 4,92 (dd, 1H,  $J_{5,6} = 6,3$ ,  $J_{5,7} = 1,4$ , H-5); 5,31 (ddd, 1H,  $J_{8,7} = 9,9$ ,  $J_{8,6} = 3,2$ ,  $J_{8,14} = 2,3$ , H-8); 5,71 (dddd, 1H,  $J_{7,8} = 9,9$ ,  $J_{7,14} = 3,2$ ,  $J_{7,6} = 2,1$ ,  $J_{7,5} = 1,3$ , H-7); 6,52 (dt, 1H,  $J_{1,2} = 8,1$ ,  $J_{1,10} = 0,9$ , H-1); 6,61 (d, 1H,  $J_{2,1} = 8,1$ , H-2).  $^{13}\text{C}$  NMR (125,7 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 26,75 ( $\text{CH}_2$ -10); 31,99 ( $\text{CH}_2$ -15); 34,91 (CH-14); 42,88 (C-13); 58,74 ( $\text{CH}_3$ -17); 60,42 ( $\text{CH}_2$ -16); 67,69 (CH-6); 75,96 (CH-9); 92,27 (CH-5); 118,74 (CH-2); 121,00 (CH-1); 123,16 (C-11); 127,61 (CH-8); 130,75 (C-12); 134,69 (CH-7); 140,53 (C-3); 147,43 (C-4).

### Kodein:



$^1\text{H}$  NMR: (500,0 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 1,81 (ddd, 1H,  $J_{\text{gem}} = 12,8$ ,  $J_{15b,16} = 3,6$ , 1,8, H-15b); 2,09 (td, 1H,  $J_{\text{gem}} = 12,8$ ,  $J_{15a,16} = 12,8$ , 5,1, H-15a); 2,38 (ddd, 1H,  $J_{\text{gem}} = 18,8$ ,  $J_{10b,9} = 6,3$ ,  $J_{10b,1} = 1,0$ , H-10b); 2,44 (ddd, 1H,  $J_{16b,15} = 12,8$ , 3,6,  $J_{\text{gem}} = 12,3$ , H-16b); 2,45 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{N}$ -17); 2,61 (dddd, 1H,  $J_{\text{gem}} = 12,3$ ,  $J_{16a,15} = 5,1$ , 1,8,  $J_{16a,9} = 0,8$ , H-16a); 2,67 (tdd, 1H,  $J_{14,9} = J_{14,7} = 3,2$ ,  $J_{14,6} = 2,3$ ,  $J_{14,8} = 2,1$ , H-14); 3,07 (d, 1H,  $J_{\text{gem}} = 18,8$ , H-10a); 3,40 (dd, 1H,  $J_{9,10b} = 6,2$ ,  $J_{9,14} = 3,2$ , H-9); 3,82 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{O}$ ); 4,19 (ddt, 1H,  $J_{6,5} = 6,2$ ,  $J_{6,8} = 3,4$ ,  $J_{6,7} = J_{6,14} = 2,3$ , H-6); 4,82 (dd, 1H,  $J_{5,6} = 6,2$ ,  $J_{5,7} = 1,3$ , H-5); 5,33 (dddd, 1H,  $J_{8,7} = 9,9$ ,  $J_{8,6} = 3,4$ ,  $J_{8,14} = 2,1$ ,  $J_{8,5} = 0,5$ , H-8); 5,64 (dddd, 1H,  $J_{7,8} = 9,9$ ,  $J_{7,14} = 3,2$ ,  $J_{7,6} = 2,3$ ,  $J_{7,5} = 1,3$ , H-7); 6,54 (dt, 1H,  $J_{1,2} = 8,2$ ,  $J_{1,10} = 1,0$ , H-1); 6,68 (d, 1H,  $J_{2,1} = 8,2$ , H-2).  $^{13}\text{C}$  NMR: (125,7 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 21,62 ( $\text{CH}_2$ -10); 36,47 ( $\text{CH}_2$ -15); 41,53 (CH-14); 43,05 ( $\text{CH}_3$ -17); 44,41 (C-13); 47,41 ( $\text{CH}_2$ -16); 57,27 ( $\text{CH}_3\text{O}$ ); 60,13 (CH-9); 68,17 (CH-6); 93,19 (CH-5); 115,16 (CH-2); 120,31 (CH-1); 128,58 (C-11); 129,53 (CH-8); 132,16 (C-12); 133,93 (CH-7); 143,35 (C-3); 148,68 (C-4).

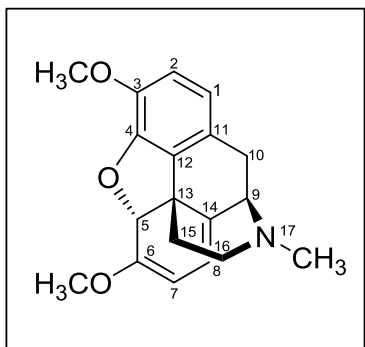
### Kodein N-oxid:



$^1\text{H}$  NMR (600.1 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 1.83 (ddd, 1H,  $J_{\text{gem}} = 13.4$ ,  $J_{15b,16} = 3.8$ , 1.7, H-15b); 2.69 (ddd, 1H,  $J_{\text{gem}} = 13.4$ ,  $J_{15a,16} = 12.8$ , 4.7, H-15a); 2.95 (ddd, 1H,  $J_{\text{gem}} = 20.9$ ,  $J_{10b,9} = 6.7$ ,  $J_{10b,1} = 0.9$ , H-10b); 3.20 (ddt, 1H,  $J_{\text{gem}} = 12.8$ ,  $J_{16b,15} = 4.7$ , 1.7,  $J_{16b,9} = 1.7$ , H-16b); 3.32 (dd, 1H,  $J_{\text{gem}} = 20.9$ ,  $J_{10a,1} = 0.9$ , H-10a); 3.37 (td, 1H,  $J_{\text{gem}} = 12.8$ ,  $J_{16a,15} = 12.8$ , 3.8, H-16a); 3.39 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{N-17}$ );

3.84 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{O}$ ); 3.86 (ddd, 1H,  $J_{9,10b} = 6.7$ ,  $J_{9,14} = 3.2$ ,  $J_{9,16b} = 1.7$ , H-9); 3.95 (qd, 1H,  $J_{14,6} = J_{14,7} = J_{14,9} = 3.2$ ,  $J_{14,8} = 2.3$ , H-14); 4.25 (dtd, 1H,  $J_{6,5} = 6.3$ ,  $J_{6,8} = J_{6,14} = 3.2$ ,  $J_{6,7} = 2.3$ , H-6); 4.93 (dd, 1H,  $J_{5,6} = 6.3$ ,  $J_{5,7} = 1.3$ , H-5); 5.33 (ddd, 1H,  $J_{8,7} = 9.9$ ,  $J_{8,6} = 3.2$ ,  $J_{8,14} = 2.3$ , H-8); 5.72 (dddd, 1H,  $J_{7,8} = 9.9$ ,  $J_{7,14} = 3.2$ ,  $J_{7,6} = 2.3$ ,  $J_{7,5} = 1.3$ , H-7); 6.61 (dt, 1H,  $J_{1,2} = 8.2$ ,  $J_{1,10} = 0.9$ , H-1); 6.76 (d, 1H,  $J_{2,1} = 8.2$ , H-2).  $^{13}\text{C}$  NMR (150.9 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 26.75 ( $\text{CH}_2$ -10); 32.11 ( $\text{CH}_2$ -15); 34.90 (CH-14); 42.84 (C-13); 57.30 ( $\text{CH}_3\text{O}$ ); 58.64 ( $\text{CH}_3$ -17); 60.35 ( $\text{CH}_2$ -16); 67.85 (CH-6); 75.88 (CH-9); 92.49 (CH-5); 116.04 (CH-2); 120.85 (CH-1); 124.55 (C-11); 127.53 (CH-8); 130.86 (C-12); 134.75 (CH-7); 144.02 (C-3); 148.70 (C-4).

### Tebain $\text{CD}_3\text{OD}$ :

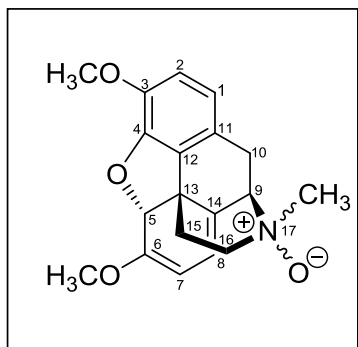


$^1\text{H}$  NMR (600.0 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 1.65 (ddd, 1H,  $J_{\text{gem}} = 12.8$ ,  $J_{15b,16} = 3.7$ , 1.7, H-15b); 2.21 (td, 1H,  $J_{\text{gem}} = 12.8$ ,  $J_{15a,16} = 12.8$ , 5.1, H-15a); 2.44 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{N-17}$ ); 2.64 (dddd, 1H,  $J_{\text{gem}} = 13.0$ ,  $J_{16a,15} = 5.1$ , 1.7,  $J_{16a,9} = 1.0$ , H-16a); 2.71 (ddd, 1H,  $J_{\text{gem}} = 18.1$ ,  $J_{10b,9} = 7.0$ ,  $J_{10b,1} = 1.0$ , H-10b); 2.83 (ddd, 1H,  $J_{\text{gem}} = 13.0$ ,  $J_{16b,15} = 12.8$ , 3.7, H-16b); 3.31 (bd, 1H,  $J_{\text{gem}} = 18.1$ , H-10a); 3.61 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{O-6}$ ); 3.64 (d, 1H,  $J_{9,10b} = 7.0$ , H-9); 3.82 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{O-3}$ ); 5.14 (d, 1H,  $J_{7,8} = 6.5$ , H-7); 5.26 (s, 1H, H-5); 5.61 (d, 1H,  $J_{8,7} = 6.5$ , H-8); 6.61 (dt, 1H,  $J_{1,2} = 8.2$ ,  $J_{1,10} = 0.9$ , H-1); 6.70 (d, 1H,  $J_{2,1} = 8.2$ , H-2).

$^{13}\text{C}$  NMR (150.9 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 30.93 ( $\text{CH}_2$ -10); 37.29 ( $\text{CH}_2$ -15); 42.16 ( $\text{CH}_3$ -17); 46.84 ( $\text{CH}_2$ -16); 47.06 (C-13); 55.42 ( $\text{CH}_3$ -6); 57.28 ( $\text{CH}_3$ -3); 62.05 (CH-9); 90.21 (CH-5); 96.96 (CH-7); 113.75 (CH-8); 115.12 (CH-2); 120.59 (CH-1); 128.94 (C-11); 132.75 (C-14); 134.69 (C-12); 144.08 (C-3); 146.00 (C-4); 154.19 (C-6).

### Tebain *N*-oxid CD<sub>3</sub>OD:

Majoritní produkt:

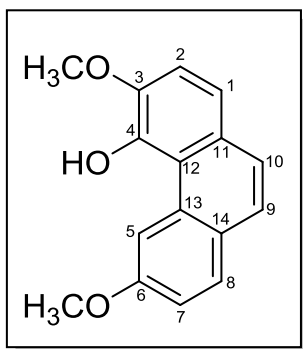


<sup>1</sup>H NMR (500,0 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 1,95 (ddd, 1H,  $J_{\text{gem}} = 14,0$ ,  $J_{15b,16} = 4,4$ , 1,6, H-15b); 2,35 (td, 1H,  $J_{\text{gem}} = 14,0$ ,  $J_{15a,16} = 14,0$ , 5,2, H-15a); 2,94 (ddd, 1H,  $J_{\text{gem}} = 19,3$ ,  $J_{10b,9} = 7,5$ ,  $J_{10b,1} = 1,0$ , H-10b); 3,29 (s, 3H, CH<sub>3</sub>N-17); 3,34 (ddt, 1H,  $J_{\text{gem}} = 13,7$ ,  $J_{16b,15} = 5,2$ , 1,6,  $J_{16b,9} = 1,6$ , H-16b); 3,42 (ddd, 1H,  $J_{16a,15} = 14,0$ , 4,4,  $J_{\text{gem}} = 13,7$ , H-16a); 3,65 (s, 3H, CH<sub>3</sub>O-6); 3,83 (s, 3H, CH<sub>3</sub>O-3); 4,14 (d, 1H,  $J_{9,10b} = 7,5$ ,  $J_{9,16a} = 1,6$ , H-9); 4,21 (dd, 1H,  $J_{\text{gem}} = 19,3$ ,  $J_{10a,1} = 1,0$ , H-10a); 5,23 (d, 1H,  $J_{7,8} = 6,6$ , H-7); 5,40 (s, 1H, H-5); 5,95 (d, 1H,  $J_{8,7} = 6,6$ , H-8); 6,69 (dt, 1H,  $J_{1,2} = 8,2$ ,  $J_{1,10} = 1,0$ , H-1); 6,77 (d, 1H,  $J_{2,1} = 8,2$ , H-2), <sup>13</sup>C NMR (125,7 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 31,39 (CH<sub>2</sub>-10); 36,04 (CH<sub>2</sub>-15); 45,32 (C-13); 55,50 (CH<sub>3</sub>-17); 55,81 (CH<sub>3</sub>-6); 57,23 (CH<sub>3</sub>-3); 61,98 (CH<sub>2</sub>-16); 77,59 (CH-9); 88,80 (CH-5); 96,45 (CH-7); 115,81 (CH-2); 119,72 (CH-8); 121,09 (CH-1); 126,31 (C-11); 126,83 (C-14); 133,32 (C-12); 144,40 (C-3); 145,88 (C-4); 155,94 (C-6).

Minoritní produkt:

<sup>1</sup>H NMR (500,0 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 1,76 (ddd, 1H,  $J_{\text{gem}} = 13,2$ ,  $J_{15b,16} = 3,9$ , 1,6, H-15b); 2,71 (td, 1H,  $J_{\text{gem}} = 13,2$ ,  $J_{15a,16} = 13,2$ , 4,8, H-15a); 3,15 (ddd, 1H,  $J_{\text{gem}} = 19,5$ ,  $J_{10b,9} = 7,3$ ,  $J_{10b,1} = 0,9$ , H-10b); 3,22 (ddt, 1H,  $J_{\text{gem}} = 12,8$ ,  $J_{16b,15} = 4,8$ , 1,6,  $J_{16b,9} = 1,6$ , H-16b); 3,36 (s, 3H, CH<sub>3</sub>N-17); 3,49 (dd, 1H,  $J_{\text{gem}} = 19,5$ ,  $J_{10a,1} = 0,9$ , H-10a); 3,57 (ddd, 1H,  $J_{16a,15} = 13,2$ , 3,9,  $J_{\text{gem}} = 12,8$ , H-16a); 3,63 (s, 3H, CH<sub>3</sub>O-6); 3,83 (s, 3H, CH<sub>3</sub>O-3); 4,20 (d, 1H,  $J_{9,10b} = 7,3$ ,  $J_{9,16a} = 1,6$ , H-9); 5,20 (d, 1H,  $J_{7,8} = 6,6$ , H-7); 5,40 (s, 1H, H-5); 5,79 (d, 1H,  $J_{8,7} = 6,6$ , H-8); 6,66 (dt, 1H,  $J_{1,2} = 8,2$ ,  $J_{1,10} = 0,9$ , H-1); 6,76 (d, 1H,  $J_{2,1} = 8,2$ , H-2), <sup>13</sup>C NMR (125,7 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 33,94 (CH<sub>2</sub>-10); 34,27 (CH<sub>2</sub>-15); 45,00 (C-13); 55,65 (CH<sub>3</sub>-6); 57,25 (CH<sub>3</sub>-3); 57,87 (CH<sub>3</sub>-17); 60,01 (CH<sub>2</sub>-16); 77,82 (CH-9); 89,46 (CH-5); 96,90 (CH-7); 115,70 (CH-2); 118,67 (CH-8); 121,15 (CH-1); 125,21 (C-11); 127,75 (C-14); 133,89 (C-12); 144,60 (C-3); 145,88 (C-4); 154,82 (C-6).

### 3,6-dimethoxyfenanthren-4-ol:



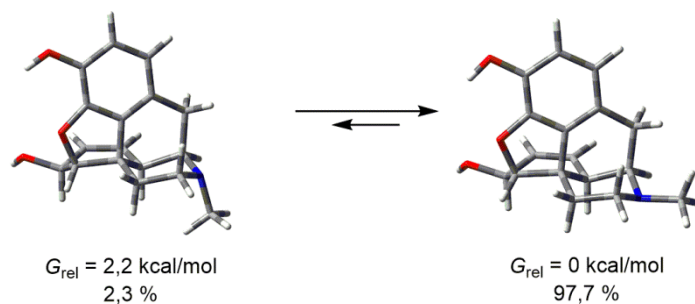
$^1\text{H}$  NMR (600,1 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): ; 3,96 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{O}$ -6); 4,02 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{O}$ -3); 7,17 (dd, 1H, ,  $J_{7,8} = 8,8$ ,  $J_{7,5} = 2,5$ , H-7); 7,36 (d, 1H,  $J_{2,1} = 2,9$  H-2); 7,38 (d, 1H, ,  $J_{1,2} = 2,9$ , H-1); 7,45 (d, 1H, ,  $J_{10,9} = 9,0$ , H-10); 7,47 (d, 1H, ,  $J_{9,10} = 9,0$ , H-9); 7,72 (d, 1H, ,  $J_{8,7} = 8,82$ , H-8); 9,37 (d, 1H,  $J_{5,7} = 2,5$ , H-5)

$^{13}\text{C}$  NMR (150,9 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 55,77 ( $\text{CH}_3\text{O}$ -6); 57,72 ( $\text{CH}_3\text{O}$ -3); 111,72 (CH-5); 113,15 (CH-2); 116,45 ( $\text{CH}_2$ -7); 120,32 (CH-1, C-12); 125,86 (CH-10); 125,99 (CH-9); 128,57 (CH-9); 129,92 (CH-8); 130,27 (CH-11); 132,94 (C-13); 145,87 (C-4); 146,10 (C-3); 159,08 (C-6).



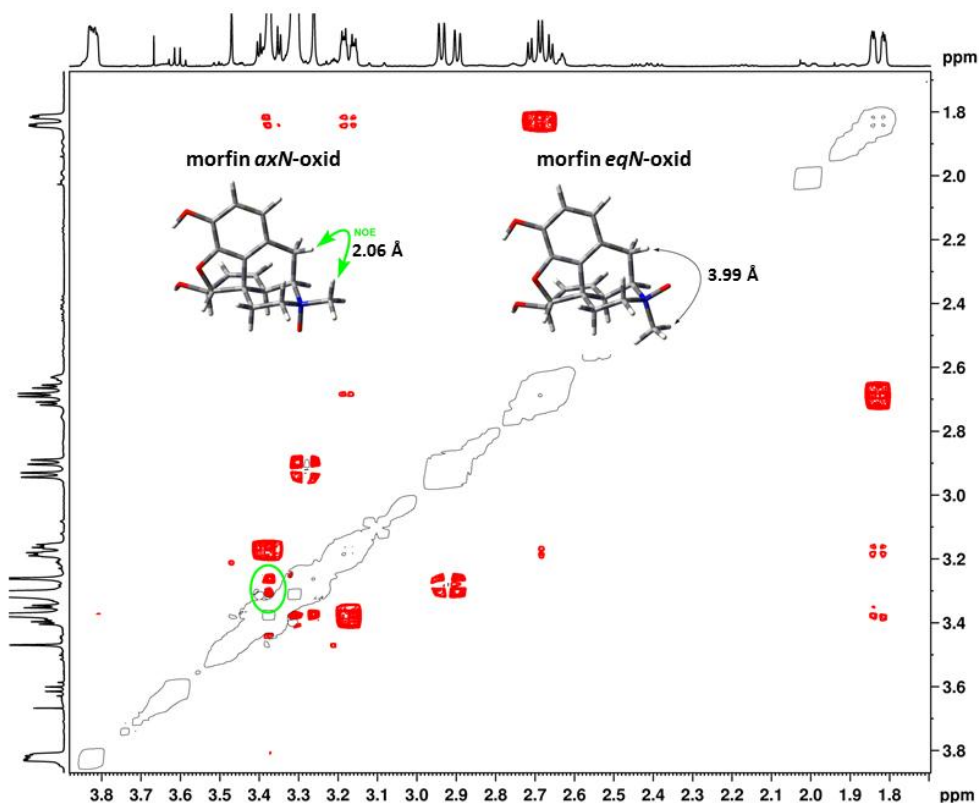
## 4.2 Oxidace morfinu

Morfin může zaujmout dvě různé konformace lišící se orientací methylové skupiny na dusíku. Nejprve byla tedy provedena optimalizace geometrie a výpočet volné Gibbsovy energie pro jednotlivé konformery pomocí DFT B3LYP/6-31G\* (Obrázek 9).



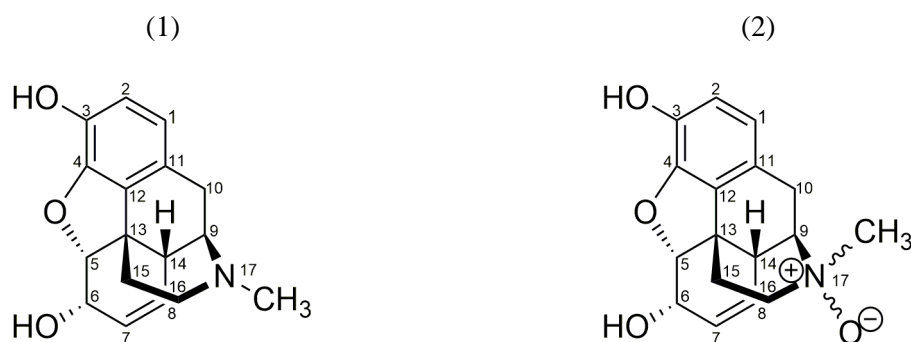
**Obrázek 9:** Zastoupení jednotlivých konformerů neoxidovaných forem morfinu uvedených v procentech, vlevo je morfin s methylem v axiální poloze a vpravo morfin s methylem v ekvatoriální poloze.

Na základě těchto dat by se dalo předpokládat, že oxidací by měl vznikat převážně jeden *N*-oxid s kyslíkem v axiální poloze. Tento předpoklad byl ověřen analýzou NMR spekter reakční směsi po oxidaci. Při analýze NMR spekter oxidovaného morfinu, byly pozorovány oba *N*-oxidy. Po integraci  $^1\text{H}$  spekter bylo určeno, že hlavního produktu se nachází v roztoku 94 % a vedlejšího produktu bylo určeno zastoupení 6 %. NMR data minoritního oxidu nebylo možné získat úplně z důvodu překryvu signálů s majoritním produktem. Relativní konfigurace hlavního produktu oxidace byla určena z  $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ -ROESY spektra (Obrázek 10, str.33), jako morfin s oxidem v axiální a methylem v ekvatoriální poloze. Na obrázku je patrná NOE (z angl. nuclear Overhauser effect) interakce mezi vodíky na methylu v poloze 17 a vodíku v poloze 10. Tato interakce je pozorovatelná pouze u morfinu s methylem v ekvatoriální poloze, protože vzdálenost mezi těmito vodíky je pouze 2,06 Å. U oxidu s methylem v axiální poloze není tato interakce pozorovatelná, protože vzdálenost 3,99 Å je příliš velká. U tohoto oxidu by byla pozorovatelná interakce mezi vodíky na methylu v poloze 17 a vodíky 14 a 16.



**Obrázek 10:** Výřez H,H-ROESY spektra oxidovaného morfinu s vyznačenou NOE interakcí mezi vodíky methylové skupiny na dusíku a vodíkem v poloze 10 pro diastereoizomer s kyslíkem v axiální poloze.

Na obrázku 11 jsou uvedeny struktury morfinu a morfinu *N*-oxidu i s příslušným číslováním jednotlivých atomů, které je dodrženo u dalšího vyhodnocování.



**Obrázek 11:** (1) morfin s příslušným číslováním atomů, (2) morfin *N*-oxid s příslušným číslováním atomů

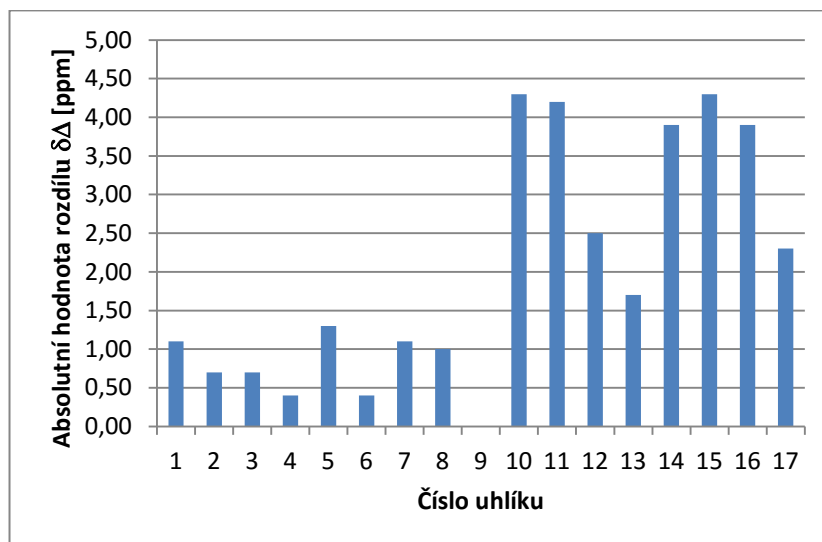
Z optimalizovaných struktur byly vypočteny NMR parametry. Z vypočtených parametrů pro chemické posuny atomů  $^{13}\text{C}$  byla vytvořena tabulka 1 (str. 34), ve které  $\Delta\delta$  znázorňuje rozdíl mezi chemickými posuny *N*-oxidů a váženým průměrem chemických posunů neoxidovaného morfinu. Vážený průměr byl vypočten jako součet jednotlivých

posunů vynásobených vypočteným zastoupením jednotlivých konformerů. V posledním sloupci je uvedena vypočtená hodnota rozdílů  $\Delta\delta$  pro oba *N*-oxidy, udávající citlivost daného chemického posunu na relativní konfiguraci *N*-oxidu. Z této závislosti byl vytvořen graf (Obrázek 12, str. 35).

**Tabulka 1:** Vypočtené chemické posuny atomů  $^{13}\text{C}$  pro morfin a morfin *N*-oxid.

Číslo atomu $^{13}\text{C}$	Morfin			Morfin <i>N</i> -Oxid				Absolutní hodnota rozdílu $\Delta\delta$ [ppm]
	$\delta$ axMe [ppm]	$\delta$ eqMe [ppm]	Vážený průměr [ppm]	$\delta$ ax <i>N</i> -oxid [ppm]	$\Delta\delta$ [ppm]	$\delta$ eq <i>N</i> -oxid [ppm]	$\Delta\delta$ [ppm]	
1	114,30	113,80	113,81	113,70	-0,11	114,80	0,99	1,10
2	108,90	110,00	109,97	110,50	0,53	111,20	1,23	0,70
3	130,50	132,20	132,16	133,80	1,64	133,10	0,94	0,70
4	140,40	139,10	139,13	139,10	-0,03	138,70	-0,43	0,40
5	88,70	92,20	92,12	92,20	0,08	90,90	-1,22	1,30
6	69,20	68,90	68,91	68,60	-0,31	69,00	0,09	0,40
7	131,90	129,00	129,07	128,50	-0,57	129,60	0,53	1,10
8	126,70	124,40	124,45	123,90	-0,55	122,90	-1,55	1,00
9	62,40	60,60	60,64	79,90	19,26	79,90	19,26	0,00
10	33,90	22,00	22,27	28,30	6,03	24,00	1,73	4,30
11	122,70	119,00	119,09	114,90	-4,19	119,10	0,01	4,20
12	129,30	124,40	124,51	124,70	0,19	122,20	-2,31	2,50
13	48,90	47,30	47,34	45,80	-1,54	47,50	0,16	1,70
14	34,70	44,60	44,37	36,20	-8,17	40,10	-4,27	3,90
15	32,00	37,80	37,67	32,30	-5,37	36,60	-1,07	4,30
16	45,70	45,80	45,80	60,20	14,40	64,10	18,30	2,90
17	41,20	42,50	42,47	57,80	15,33	55,50	13,03	2,30

Chemický posun ( $\delta$ ); rozdíl chemických posunů po a před oxidací ( $\Delta\delta$ ); morfin s methylem v ekvatoriální poloze (eqMe); morfin s methylem v axiální poloze (axMe); morfin *N*-oxid s kyslíkem v axiální poloze (ax*N*-oxid); morfin *N*-oxid s kyslíkem v ekvatoriální poloze (eq*N*-oxid).



**Obrázek 12:** Citlivost vypočtených  $^{13}\text{C}$  chemický posunů morfin *N*-oxidu na relativní konfiguraci.

Z obrázku 12 jsou patrné uhlíky, které jsou nejvíce citlivé na změnu relativní konfigurace *N*-oxidu. Protože chyba výpočtu  $^{13}\text{C}$  chemických posunů bývá běžně až 3 ppm, byly k porovnání vybrány pouze uhlíky, jejichž rozdíl chemických posunů je větší, než 3 ppm - diagnostické  $^{13}\text{C}$  signály. Diagnostické signály byly použity pro výpočet střední absolutní odchylky (MAE z angl. mean absolute error) vypočtených a experimentálních  $^{13}\text{C}$  chemických posunů. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 2 (str. 34). MAE může být použita jako parametr při stanovení relativní konfigurace *N*-oxidu. Čím menší je tato odchylka, tím více se vypočtené chemické posuny shodují s experimentálními. Z tabulky je také patrné, jak může "referencování" vypočtených  $^{13}\text{C}$  chemických posunů ovlivnit hodnotu MAE. Proto je v této tabulce uvedena i MAE, kde byl zanedbán uhlík 11 v aromatické části molekuly. Protože byl použit jako standard TMS, který neobsahuje žádné aromatické uhlíky, může být vypočtený chemický posun aromatické části zkoumané molekuly zatížen větší chybou. Pro odstranění této chyby by musel být pro výpočet použit jiný standard, který obsahuje aromatické uhlíky. V tabulce 2 je také vidět, že touto chybou jsou zatíženy pouze absolutní hodnoty  $^{13}\text{C}$  chemických posunů ( $\delta(^{13}\text{C})$ ), protože  $\Delta\delta(^{13}\text{C})$  hodnoty jsou nezávislé na "referencování". Z tabulky 2 je dále patrné, že pro axiální *N*-oxid je absolutní odchylka menší, než pro ekvatoriální *N*-oxid, což je v souladu s výsledky získanými z H,H-ROESY spekter.

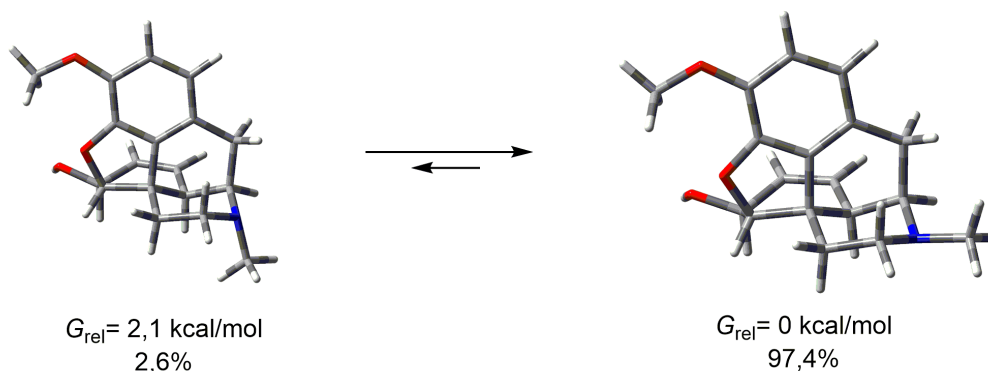
**Tabulka 2:** Vypočtené průměrné absolutní odchylky  $^{13}\text{C}$  chemických posunů pro obě konfigurace morfin *N*-oxidu.

Diagnostické $^{13}\text{C}$ signály	MAE( $\delta$ ( $^{13}\text{C}$ ))		MAE( $\Delta\delta$ ( $^{13}\text{C}$ ))	
	ax <i>N</i> -oxid [ppm]	eq <i>N</i> -oxid [ppm]	ax <i>N</i> -oxid [ppm]	eq <i>N</i> -oxid [ppm]
10, 11, 14, 15, 16	2,33	4,06	1,04	3,67
10, 14, 15, 16	0,61	4,49	1,36	3,65

Průměrná absolutní odchylka  $^{13}\text{C}$  chemických posunů (MAE( $\delta$  ( $^{13}\text{C}$ ))); průměrná absolutní odchylka rozdílu  $^{13}\text{C}$  chemických posunů po a před oxidací MAE( $\Delta\delta$  ( $^{13}\text{C}$ ))); morfin *N*-oxid s kyslíkem v axiální poloze (ax*N*-oxid); morfin *N*-oxid s kyslíkem v ekvatoriální poloze (eq*N*-oxid).

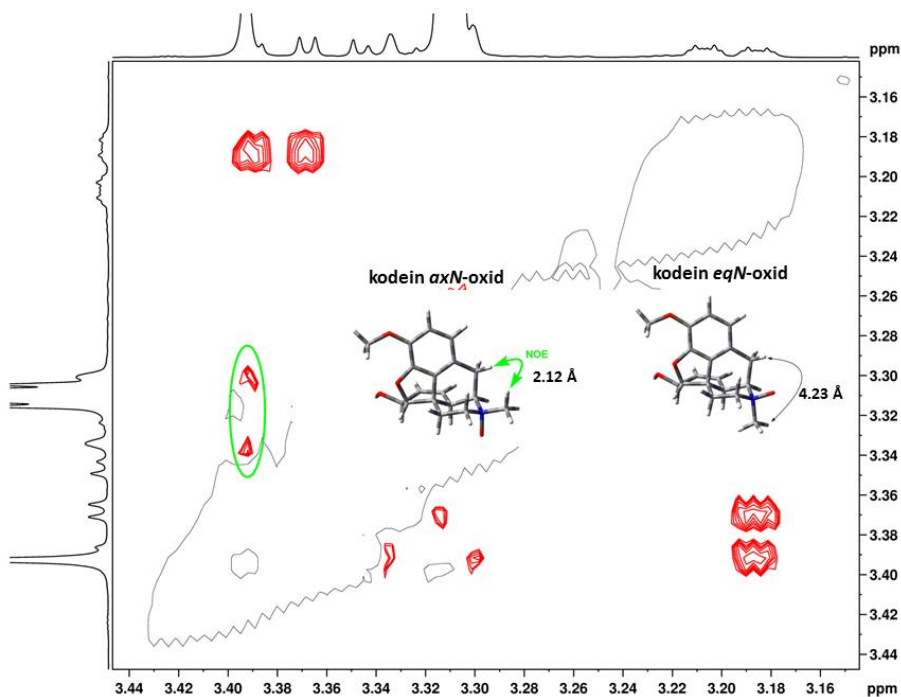
### 4.3 Oxidace kodeinu

Kodein stejně jako morfin může zaujmout dvě různé konformace lišící se orientací methylové skupiny na dusíku. Nejprve byla tedy provedena optimalizace geometrie a výpočet volné Gibbsovy energie pro jednotlivé konformery pomocí DFT B3LYP/6-31G\* (Obrázek 13).



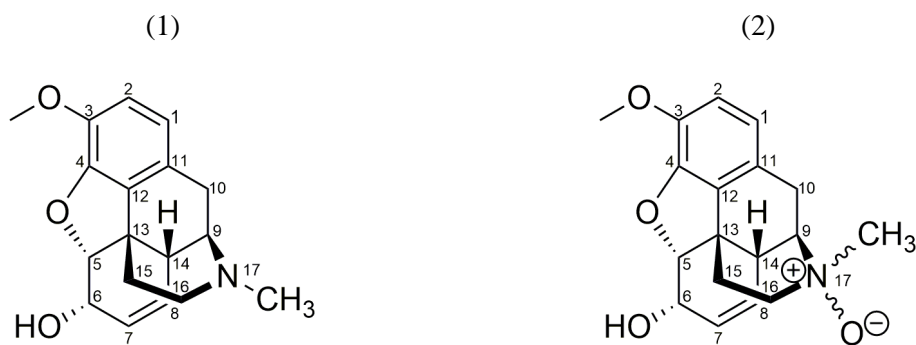
**Obrázek 13:** Zastoupení jednotlivých konformerů neoxidovaných forem kodeinu uvedených v procentech, vlevo je kodein s methylem v axiální poloze a vpravo kodein s methylem v ekvatoriální poloze.

Na základě těchto dat by se dalo předpokládat, že oxidací by měl vznikat, stejně jako u morfinu, převážně jeden *N*-oxid s kyslíkem v axiální poloze. Při analýze NMR spekter byly v reakční směsi detekovány oba *N*-oxidy. Po integraci  $^1\text{H}$  spekter bylo určeno, že hlavního produktu se nachází v roztoku 96 % a vedlejšího produktu bylo určeno zastoupení 4 %. NMR data minoritního oxidu nebylo možné získat úplně, protože stejně jako u morfinu docházelo k překryvu signálů s majoritním produktem. Relativní konfigurace hlavního produktu oxidace byla určena také z H,H-ROESY spektra (Obrázek 14, str. 38), jako kodein s kyslíkem v axiální a methylem v ekvatoriální poloze. Na obrázku 14 je patrná NOE interakce mezi vodíky na methylu v poloze 17 a vodíku v poloze 10. Tato interakce je pozorovatelná také pouze u kodeinu s methylem v ekvatoriální poloze, protože vzdálenost mezi těmito vodíky je 2,12 Å. U oxidu s methylem v axiální poloze není tato interakce pozorovatelná, protože vzdálenost je příliš velká: 4,23 Å. U tohoto oxidu by byla pozorovatelná interakce mezi vodíky na methylu v poloze 17 a vodíky 14 a 16.



**Obrázek 14:** Výřez H,H-ROESY spektra oxidovaného kodeinu s vyznačenou NOE interakcí mezi vodíky methylové skupiny na dusíku a vodíkem v poloze 10, pro kodein *N*-oxid s kyslíkem v axiální poloze.

Na obrázku 15 jsou uvedeny struktury kodeinu a kodeinu *N*-oxidu i s příslušným číslováním jednotlivých atomů, které je dodrženo u dalšího vyhodnocování.



**Obrázek 15:** (1) kodein s příslušným číslováním atomů, (2) kodein *N*-oxid s příslušným číslováním atomů.

Následně byly z optimalizovaných struktur vypočteny NMR parametry. Z vypočtených parametrů pro chemické posuny atomů  $^{13}\text{C}$  byla vytvořena tabulka 3 (str. 39), podobně jako u morfinu.

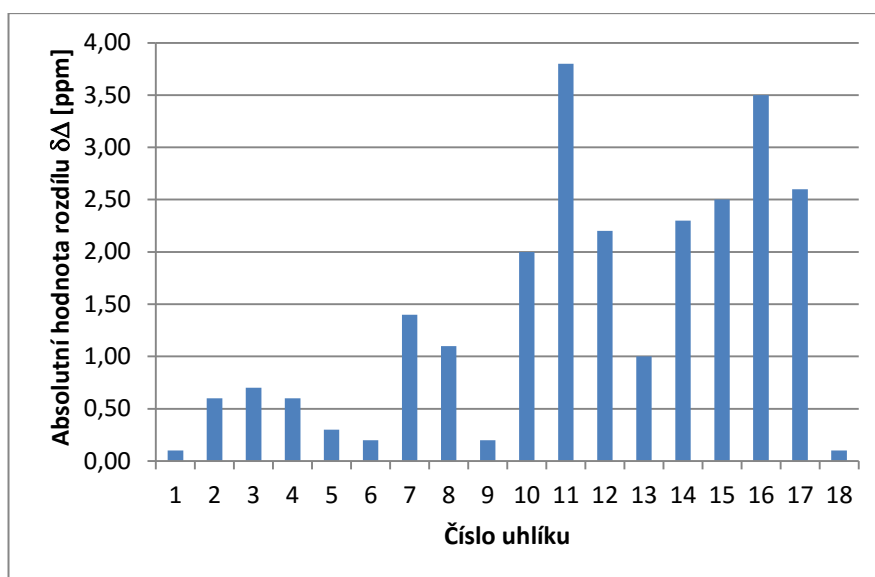
**Tabulka 3:** Vypočtené chemické posuny atomů  $^{13}\text{C}$  pro kodein a kodein *N*-oxid.

Kodein				Kodein <i>N</i> -oxid				Absolutní hodnota rozdílu $\Delta\delta$ [ppm]
Číslo atomu $^{13}\text{C}$	axMe [ppm]	eqMe [ppm]	Vážený průměr [ppm]	ex <i>N</i> -oxid [ppm]	$\Delta\delta$ [ppm]	eq <i>N</i> -oxid [ppm]	$\Delta\delta$ [ppm]	
1	113,80	113,90	113,80	114,20	0,40	114,30	0,50	0,10
2	113,70	113,90	113,71	111,60	-2,11	112,20	-1,51	0,60
3	135,40	135,40	135,40	133,60	-1,80	132,90	-2,50	0,70
4	139,40	139,30	139,40	140,10	0,70	139,50	0,10	0,60
5	90,40	91,20	90,42	86,80	-3,62	86,50	-3,92	0,30
6	68,40	68,30	68,40	68,60	0,20	68,80	0,40	0,20
7	129,30	130,30	129,33	130,40	1,07	131,80	2,47	1,40
8	124,00	124,30	124,00	125,50	1,50	124,40	0,40	1,10
9	60,70	60,90	60,71	74,30	13,59	74,50	13,79	0,20
10	22,00	33,30	22,29	29,70	7,41	27,70	5,41	2,00
11	119,30	119,40	119,30	118,80	-0,50	122,60	3,30	3,80
12	126,40	125,80	126,38	131,00	4,62	128,80	2,42	2,20
13	46,10	47,90	46,15	45,90	-0,25	46,90	0,75	1,00
14	44,00	35,10	43,77	37,50	-6,27	39,80	-3,97	2,30
15	37,50	31,70	37,35	35,60	-1,75	38,10	0,75	2,50
16	45,70	45,20	45,69	57,70	12,01	61,20	15,51	3,50
17	42,50	40,90	42,46	57,20	14,74	54,60	12,14	2,60
3-OMe (18)	56,60	56,60	56,60	53,20	-3,40	53,10	-3,50	0,10

Chemický posun ( $\delta$ ); rozdíl chemických posunů po a před oxidací ( $\Delta\delta$ ); kodein s methylem v ekvatoriální poloze (eqMe); kodein s methylem v axiální poloze (axMe); kodein *N*-oxid s kyslíkem v axiální poloze (ax*N*-oxid); kodein *N*-oxid s kyslíkem v ekvatoriální poloze (eq*N*-oxid).

Absolutní hodnoty rozdílu  $\Delta\delta$  byly vyneseny do grafu znázorňujícího citlivost chemického posunu kodeinu *N*-oxidu na relativní konfiguraci (Obrázek 16, str. 40).





**Obrázek 16:** Citlivost vypočtených  $^{13}\text{C}$  chemický posunů kodein *N*-oxidu na relativní konfiguraci.

Následně byly vypočteny hodnoty MAE, stejným způsobem, jako u morfinu, ale v tomto případě byly započítané i uhlíky, jejichž rozdíl chemických posunů byl větší než 2 ppm, protože z grafu je patrné, že práh 3 ppm překročí pouze dva uhlíky (11 a 16) a to je nedostatečný soubor k statistickému vyhodnocení. Z těchto dat je patrné, že oxidace kodeinu vede ke stejným výsledkům jako u morfinu. V druhém souboru hodnot byl také odstraněn uhlík 11, ze stejného důvodu jako u morfinu. Jednotlivé hodnoty MAE jsou uvedeny v tabulce 4 (str. 41). V posledním řádku tabulky jsou uvedeny hodnoty pro práh chemických posunů větších než 3 ppm (uhlíky 11 a 16), v tomto řádku je nejlépe vidět chyba způsobená vztažením na TMS. Hodnoty  $\delta$  ( $^{13}\text{C}$ ) ukazují větší odchylku u *N*-oxidu s kyslíkem v axiální poloze, což je v rozporu s experimentálními daty, ale hodnoty  $\Delta\delta$  ( $^{13}\text{C}$ ) již ukazují větší odchylku u minoritního produktu. Z tabulky je patrné, že výsledek je podobný jako u morfinu *N*-oxidu. U axiálního *N*-oxidu je absolutní odchylka menší, než u ekvatoriálního *N*-oxidu, což je v souladu s výsledky získaných z H,H-ROESY spekter.

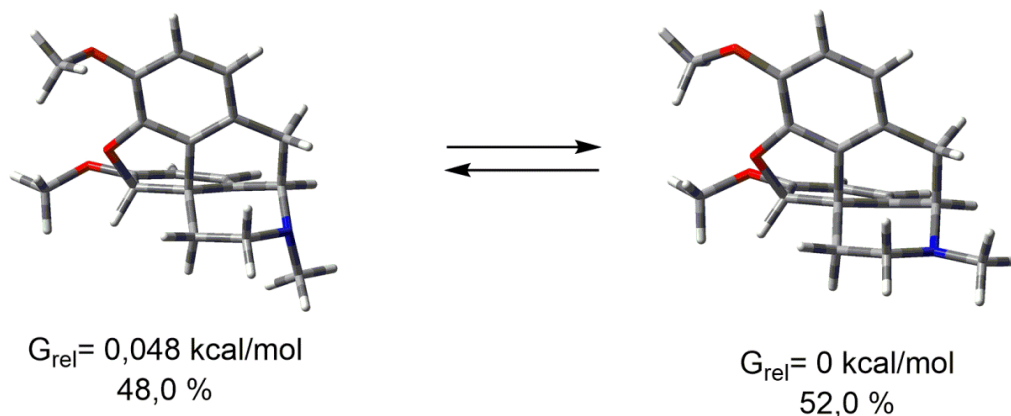
**Tabulka 4:** Vypočtené průměrné absolutní odchylky  $^{13}\text{C}$  chemických posunů pro obě konfigurace kodein *N*-oxidu.

Diagnostické $^{13}\text{C}$ uhlíky	MAE( $\delta (^{13}\text{C})$ )		MAE( $\Delta\delta (^{13}\text{C})$ )	
	ax <i>N</i> -oxid [ppm]	eq <i>N</i> -oxid [ppm]	ax <i>N</i> -oxid [ppm]	eq <i>N</i> -oxid [ppm]
11, 12,14, 15, 16, 17	2,69	3,30	2,32	4,19
14, 15, 16	2,45	3,95	1,11	3,52
11,16	4,2	1,4	2,08	5,10

Průměrná absolutní odchylka  $^{13}\text{C}$  chemických posunů (MAE( $\delta (^{13}\text{C})$ )); průměrná absolutní odchylka rozdílu  $^{13}\text{C}$  chemických posunů po a před oxidací MAE( $\Delta\delta (^{13}\text{C})$ ); kodein *N*-oxid s kyslíkem v axiální poloze (ax*N*-oxid); kodein *N*-oxid s kyslíkem v ekvatoriální poloze (eq*N*-oxid)

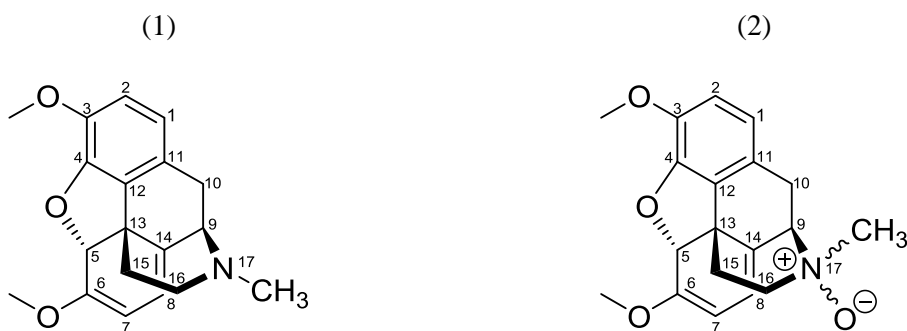
#### 4.4 Oxidace tebainu

Tebain stejně jako morfinu a kodein může zaujmout dvě různé konformace lišící se orientací methylové skupiny na dusíku. Nejprve byla tedy provedena optimalizace geometrie a výpočet volné Gibbsovy energie pro jednotlivé konformery pomocí DFT B3LYP/6-31G\* (Obrázek 17). Z tohoto výpočtu je patrné, že rovnováha není jednoznačně posunuta k jednomu konformeru, jako tomu bylo u morfinu a kodeinu.



**Obrázek 17:** Zastoupení jednotlivých konformerů neoxidovaných forem tebainu uvedených v procentech, vlevo je tebain s methylem v axiální poloze a vpravo tebain s methylem v ekvatoriální poloze.

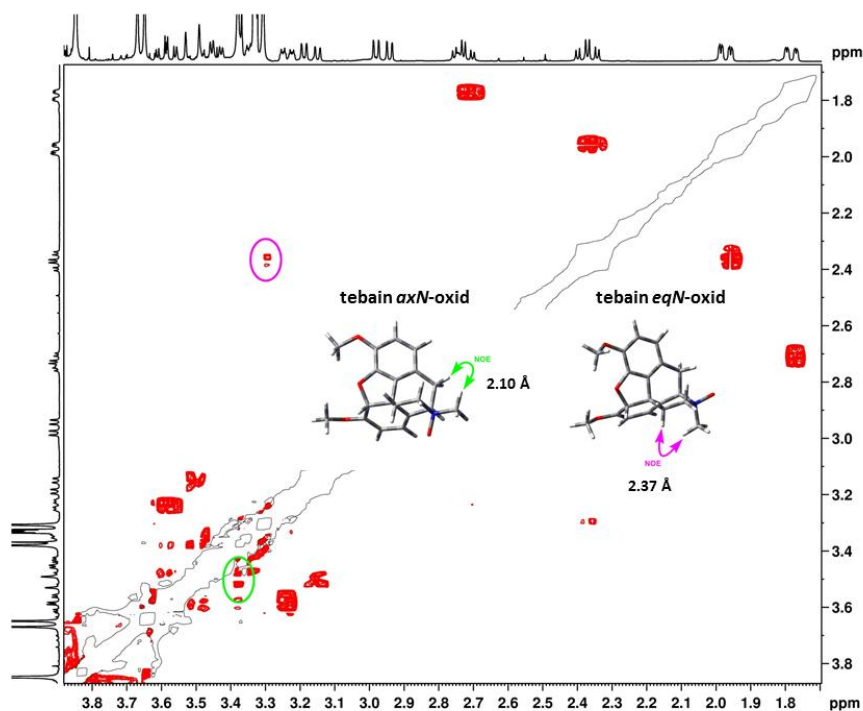
Z těchto dat je tedy patrné, že by při oxidaci měly vzniknout oba *N*-oxidy, přibližně ve stejném množství. Při analýze NMR dat bylo zjištěno, že se produkty oxidace liší u jednotlivých způsobů oxidace. Při oxidaci peroxidem vodíku při pokojové teplotě jeden a půl měsíce, vznikají dva *N*-oxidy. Zatímco při oxidaci peroxidem vodíku a zahřívání při 60 °C jeden týden vzniká pouze jeden *N*-oxid, druhý z těchto *N*-oxidů podléhá rozpadu na jiný produkt. Na obrázku 18 jsou uvedeny struktury tebainu s číslováním atomů, které je dodrženo u dalšího vyhodnocení.



**Obrázek 18:** (1) tebain s příslušným číslováním atomů, (2) tebain *N*-oxid s příslušným číslováním atomů.

#### 4.4.1 Oxidace tebainu: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> při pokojové teplotě 1,5 měsíce

V tomto případě byly v roztoku identifikovány dva *N*-oxidy. Při integraci bylo zjištěno, že majoritního produktu se v roztoku nachází 54,6 % a minoritního produktu 45,4 %. Relativní konfigurace obou produktů oxidace byla určena také z H,H-ROESY spektra (Obrázek 19). Hlavním produktem byl v tomto případě stanoven tebain s kyslíkem v ekvatoriální poloze a vedlejší produkt, jako tebain s kyslíkem v axiální poloze.



**Obrázek 19:** Výřez H,H-ROESY spektra oxidovaného tebainu s zeleně vyznačenou NOE interakcí mezi vodíky methylové skupiny na dusíku a vodíkem v poloze 10 pro tebain *N*-oxid s kyslíkem v axiální poloze a fialově vyznačenou NOE interakcí mezi vodíky methylové skupiny na dusíku a vodíkem v poloze 15 pro tebain *N*-oxid s kyslíkem v ekvatoriální poloze.

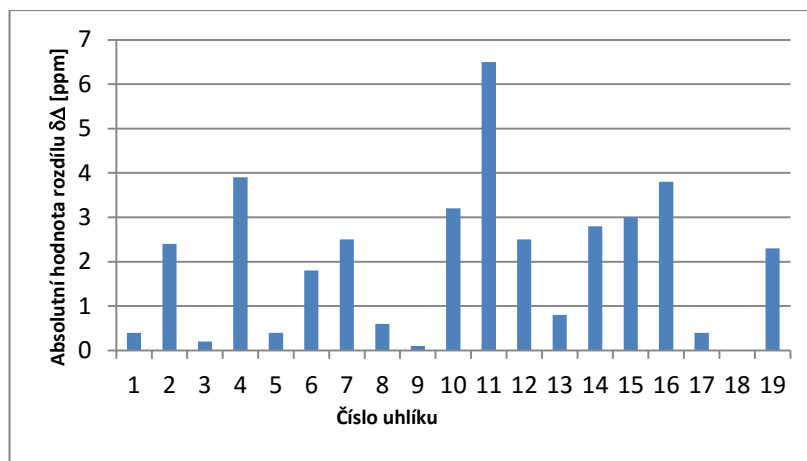
V tabulce 5 (str. 44), jsou uvedeny všechny vypočtené hodnoty chemických posunů atomů <sup>13</sup>C.

**Tabulka 5:** Vypočtené chemické posuny atomů  $^{13}\text{C}$  pro tebain a tebain *N*-oxid.

Číslo atomu $^{13}\text{C}$	axMe [ppm]	eqMe [ppm]	Vážený průměr [ppm]	ex <i>N</i> - oxid [ppm]	$\Delta\delta$ [ppm]	eq <i>N</i> - oxid [ppm]	$\Delta\delta$ [ppm]	Absolutní hodnota rozdílu $\Delta\delta$ [ppm]
1	114,70	114,20	114,44	114,6	0,16	114,2	-0,24	0,40
2	122,10	113,50	117,63	116,3	-1,33	113,9	-3,73	2,40
3	134,70	135,40	135,06	135,9	0,84	136,1	1,04	0,20
4	141,40	136,10	138,64	140,2	1,56	136,3	-2,34	3,90
5	86,20	86,10	86,15	85,6	-0,55	86,00	-0,15	0,40
6	145,70	144,90	145,28	146,5	1,22	144,7	-0,58	1,80
7	100,50	101,90	101,23	100,00	-1,23	102,5	1,27	2,50
8	111,20	107,80	109,43	113,00	3,57	113,6	4,17	0,60
9	62,20	62,50	62,36	81,3	18,94	81,2	18,84	0,10
10	39,70	28,20	33,72	32,7	-1,02	35,9	2,18	3,20
11	125,30	121,20	123,17	123,6	0,43	117,1	-6,07	6,50
12	128,40	128,60	128,50	126,5	-2,00	129,00	0,50	2,50
13	51,20	49,90	50,52	49,1	-1,42	48,3	-2,22	0,80
14	127,90	129,40	128,68	123,9	-4,78	126,7	-1,98	2,80
15	37,30	40,90	39,17	39,5	0,33	36,5	-2,67	3,00
16	45,10	45,60	45,36	64,1	18,74	60,3	14,94	3,80
17	59,30	56,20	57,69	55,9	-1,79	56,3	-1,39	0,40
3-OMe (18)	52,50	52,30	52,40	52,4	0,00	52,4	0,00	0,00
6-OMe (19)	40,80	42,20	41,53	55,7	14,17	58	16,47	2,30

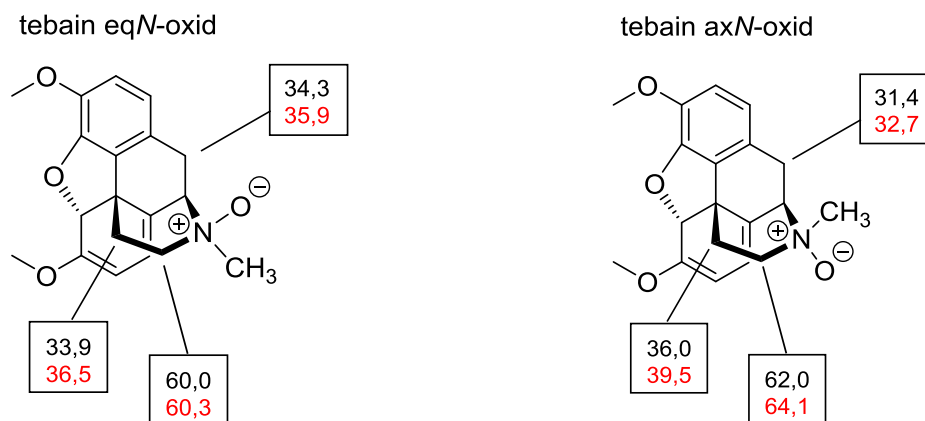
Chemický posun ( $\delta$ ); rozdíl chemických posunů po a před oxidací ( $\Delta\delta$ ); tebain s methylem v ekvatoriální poloze (eqMe); tebain s methylem v axiální poloze (axMe); tebain *N*-oxid s kyslíkem v axiální poloze (ax*N*-oxid); tebain *N*-oxid s kyslíkem v ekvatoriální poloze (eq*N*-oxid).

Z hodnot absolutních rozdílů  $\Delta\delta$  byl vytvořen stejně jako u morfinu a kodeinu graf znázorňující citlivost chemického posunu tebainu *N*-oxidu na relativní konfiguraci (Obrázek 20, str. 45).



**Obrázek 20:** Citlivost vypočtených  $^{13}\text{C}$  chemický posunů tebain *N*-oxidu na relativní konfiguraci.

Na obrázku 21 jsou uvedeny obě struktury vznikajících *N*-oxidů. U diagnostických uhlíků, jejichž chemický posun je nejvíce citlivý na rozdílnou konfiguraci tebainu *N*-oxidu (uhlíky: 10, 15, 16), jsou uvedeny hodnoty experimentálně naměřených chemických posunů a vypočtených chemických posunů.



**Obrázek 21:** Vlevo je uveden tebain *N*-oxid s kyslíkem v ekvatoriální poloze s vyznačenými diagnostickými uhlíky, černě psané hodnoty jsou experimentální posuny (ppm), červeně psané hodnoty jsou vypočtené chemické posuny (ppm), vpravo je uveden tebain *N*-oxid s kyslíkem v axiální poloze s vyznačenými diagnostickými uhlíky, černě psané hodnoty jsou experimentální posuny (ppm), červeně psané hodnoty jsou vypočtené chemické posuny (ppm).

Z obrázku 21 je patrné, že vypočtené hodnoty se shodují z experimentálně naměřenými hodnotami. Podle výpočtu energií bylo předpokládáno, že více zastoupen bude tebain *N*-oxid s kyslíkem v axiální poloze. Z experimentálních dat a vypočtených NMR posunů však vyplývá, že majoritním produktem je tebain *N*-oxid s kyslíkem v ekvatoriální poloze. Tato chyba je pravděpodobně způsobena nepřesným výpočtem energií jednotlivých konformerů tebainu.

#### 4.4.2 Oxidace tebainu: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> při 60 °C jeden týden

V tomto případě vzniká pouze jeden *N*-oxid a druhý podléhá rozpadu. Porovnáním spekter z oxidace peroxidem vodíku při pokojové teplotě bylo zjištěno, že v roztoku se nachází pouze tebain *N*-oxid s kyslíkem v axiální poloze.

Na obrázku 22 je uvedena struktura produktu vzniklého rozkladem druhého tebain *N*-oxidu. Důvodem vzniku tohoto produktu je pozice kyslíku v ekvatoriální poloze, který deprotonuje vodík v poloze 10, a následně dojde k rozpadu vzniklého *N*-oxidu. Tento proces, ke kterému dochází za pokojové teploty je popsán v literatuře<sup>76</sup>. Produkt této reakce je ukázán na obrázku 22 (2).



**Obrázek 22:** (1) Rozkladný produkt po oxidaci tebainu, při zahřátí na 60 °C jeden týden, (2) rozkladný produkt oxidace tebainu při laboratorní teplotě uváděný v literatuře.

V případě oxidace při zvýšené teplotě dochází k úplné oxidaci a aromatizaci. Struktura tohoto produktu byla určena z naměřených NMR spekter. Konečným produktem této oxidace je 3,6-dimethoxyfenanthren-4-ol (Obrázek 22 (1)).

## 5 Závěr

Cílem praktické části bakalářské práce bylo určit relativní konfigurace *N*-oxidů morfinu, kodeinu a tebainu vzniklých *in situ* oxidací pomocí NMR a molekulového modelování. Bylo zjištěno, že u morfinu a kodeinu vzniká převážně jeden *N*-oxid s kyslíkem v axiální poloze. Zatímco u tebainu je hlavním produktem *N*-oxid s kyslíkem v ekvatoriální poloze, který při zvýšené teplotě podléhá rozkladu. Bylo zjištěno, že diastereoselektivitu oxidace je možné předpovědět teoreticky výpočtem volných Gibbsových energií konformerů výchozích alkaloidů.

Dále byla vyvinuta a ověřena alternativní metoda stanovení relativní konfigurace morfinanových *N*-oxidů, která je založena na porovnání vypočtených a naměřených chemických  $^{13}\text{C}$  posunů. Výsledky této metody korespondují s výsledky získanými z NOE měření a proto tato metoda může být s úspěchem používána i při stanovení relativní konfigurace *N*-oxidů dalších alkaloidů.



## Seznam použité literatury

1. Bird, D.; Franceschi, V.; Facchini, P., *Plant Cell* 2003, 15 (11), 2626-2635.
2. Frick, S.; Kramell, R.; Schmidt, K.; Fist, A.; Kutchan, T., *Journal of Natural Products* 2005, 68 (5), 666-673.
3. Aniszewski, T.; Ciesiolka, D.; Gulewicz, K., *Phytochemistry* 2001, 57 (1), 43-50.
4. Facchini, P., *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 2001, 52, 29-66.
5. Hodges, C.; Horn, J.; Rapoport, H., *Phytochemistry* 1977, 16 (12), 1939-1942.
6. Armstrong, S.; Cozza, K., *Psychosomatics* 2003, 44 (2), 167-171.
7. Facchini, P.; Park, S., *Phytochemistry* 2003, 64 (1), 177-186.
8. Onoyovwe, A.; Hagel, J.; Chen, X.; Khan, M.; Schriemer, D.; Facchini, P., *Plant Cell* 2013, 25 (10), 4110-4122.
9. Brownstein, M., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993, 90 (12), 5391-5393.
10. Paice, J.; Penn, R.; Shott, S., *Journal of Pain and Symptom Management* 1996, 11 (2), 71-80.
11. Pattinson, K.; Governo, R.; MacIntosh, B.; Russell, E.; Corfield, D.; Tracey, I.; Wise, R., *Journal of Neuroscience* 2009, 29 (25), 8177-8186; Pattinson, K., *British Journal of Anaesthesia* 2008, 100 (6), 747-758.
12. Gilson, A.; Ryan, K.; Joranson, D.; Dahl, J., *Journal of Pain and Symptom Management* 2004, 28 (2), 176-188.
13. Blakemore, P.; White, J., *Chemical Communications* 2002, (11), 1159-1168.
14. Rinner, U.; Hudlicky, T.; Knolker, H., *Alkaloid Synthesis* 2012, 309, 33-66.
15. Chida, N.; Nagase, H., *Chemistry of Opioids* 2011, 299, 1-28.
16. Nakagawa, A.; Minami, H.; Kim, J.; Koyanagi, T.; Katayama, T.; Sato, F.; Kumagai, H., *Nature Communications* 2011, 2.
17. Corbett, A.; Henderson, G.; McKnight, A.; Paterson, S., *British Journal of Pharmacology* 2006, 147, S153-S162.
18. Hamel, E.; Beaudet, A., *Nature* 1984, 312 (5990), 155-157.
19. Waldhoer, M.; Bartlett, S.; Whistler, J., *Annual Review of Biochemistry* 2004, 73, 953-990.
20. J. Ahonen, G. A., B. Antkowiak, M. Arras, V. Billard, P. Bischoff, T.W. Bouillon, *Handbook of Experimental Pharmacology*. 2008; Vol. 182.
21. Chen, Y.; Mestek, A.; Liu, J.; Yu, L., *Biochemical Journal* 1993, 295, 625-628.
22. Al-Hasani, R.; Bruchas, M., *Anesthesiology* 2011, 115 (6), 1363-1381.
23. Cadet, P., *Medical Science Monitor* 2004, 10 (6), MS28-MS32.
24. Dhawan, B.; Cesselin, F.; Raghubir, R.; Reisine, T.; Bradley, P.; Portoghese, P.; Hamon, M., *Pharmacological Reviews* 1996, 48 (4), 567-592.
25. Mizoguchi, H.; Watanabe, H.; Hayashi, T.; Sakurada, W.; Sawai, T.; Fujimura, T.; Sakurada, T.; Sakurada, S., *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2006, 317 (1), 362-368.
26. Chen, W.; Chung, H.; Cheng, J., *World Journal of Gastroenterology* 2012, 18 (12), 1391-1396.
27. Stefano, G.; Hartman, A.; Bilfinger, T.; Magazine, H.; Liu, Y.; Casares, F.; Goligorsky, M., *Journal of Biological Chemistry* 1995, 270 (51), 30290-30293.
28. McDonald L.; Joss, J.; Dores, R., *General and Comparative Endocrinology* 1991, 84 (2), 228-236.

29. Heyman, J.; Vaught, J.; Mosberg, H.; Haaseth, R.; Porreca, F., *European Journal of Pharmacology* 1989, *165* (1), 1-10.
30. Evans, C.; Keith, D.; Morrison, H.; Magendzo, K.; Edwards, R., *Science* 1992, *258* (5090), 1952-1955.
31. Thompson, C.; Wojno, H.; Greiner, E.; May, E.; Rice, K.; Selley, D., *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2004, *308* (2), 547-554.
32. Chavkin, C.; James, I.; Goldenstein, A., *Science* 1982, *215* (4531), 413-415.
33. Han, J.; Xie, C., *Life Sciences* 1982, *31* (16-1), 1781-1784.
34. Land, B.; Bruchas, M.; Lemos, J.; Xu, M.; Melief, E.; Chavkin, C., *Journal of Neuroscience* 2008, *28* (2), 407-414.
35. Zan, G.; Wang, Q.; Wang, Y.; Liu, Y.; Hang, A.; Shu, X.; Liu, J., *Behavioural Brain Research* 2015, *291*, 334-341.
36. Butour, J.; Moisand, C.; Mazarguil, H.; Mollereau, C.; Meunier, J., *European Journal of Pharmacology* 1997, *321* (1), 97-103.
37. Khroyan, T.; Polgar, W.; Orduna, J.; Jiang, F.; Olsen, C.; Toll, L.; Zaveri, N., *European Journal of Pharmacology* 2009, *610* (1-3), 49-54.
38. Loguinov, A.; Anderson, L.; Crosby, G.; Yukhananov, R., *Physiological Genomics* 2001, *6* (3), 169-181.
39. Parkitna, J.; Bilecki, W.; Mierzejewski, P.; Stefanski, R.; Ligeza, A.; Bargiela, A.; Ziolkowska, B.; Kostowski, W.; Przewlocki, R., *Journal of Neurochemistry* 2004, *91* (1), 38-48.
40. Gullo, C.; Teoh, G., *Immunology Letters* 2004, *94* (1-2), 1-10.
41. Ammon-Treiber, S.; Holtt, V., *Addiction Biology* 2005, *10* (1), 81-89.
42. Ammon, S.; Mayer, P.; Riechert, U.; Tischmeyer, H.; Holtt, V., *Molecular Brain Research* 2003, *112* (1-2), 113-125.
43. Moore, A.; Sear, J.; Baldwin, D.; Allen, M.; Hunnisset, A.; Bullingham, R.; McQuay, H., *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 1984, *35* (5), 641-645.
44. Trescot, A.; Datta, S.; Lee, M.; Hansen, H., *Pain Physician* 2008, *11* (2), S133-S153.
45. Frolich, N.; Dees, C.; Patz, C.; Lohse, M.; Nikolaev, V.; Zenk, M., *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 2011, *383*, 21-21.
46. Babul, N.; Darke, A., *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 1993, *54* (3), 286-292.
47. Janicki, P.; Erskine, W.; James, M., *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 1991, *18* (3), 193-194.
48. de Wildt, S.; Kearns, G.; Leeder, J.; van den Anker, J., *Clinical Pharmacokinetics* 1999, *36* (6), 439-452.
49. Shimomura, K.; Kamata, O.; Ueki, S.; Ida, S.; Oguri, K.; Yoshimura, H.; Tsukamoto, H., *Tohoku Journal of Experimental Medicine* 1971, *105* (1), 45-52.
50. van Dorp, E.; Romberg, R.; Sartori, E.; Bovill, J.; Dahan, A., *Anesthesia and Analgesia* 2006, *102* (6), 1789-1797.
51. Osborne, R.; Thompson, P.; Joel, S.; Trew, D.; Patel, N.; Slevin, M., *British Journal of Clinical Pharmacology* 1992, *34* (2), 130-138.
52. Thompson, P.; Hucks, D.; McLoughlin, L.; Grossman, A.; Rees, L.; Slevin, M., *British Journal of Cancer* 1990, *62* (3), 484-484.
53. Don, H.; Dieppa, R.; Taylor, P., *Anesthesiology* 1975, *42* (6), 745-747.
54. Coffman, B.; Rios, G.; King, C.; Tephly, T., *Drug Metabolism and Disposition* 1997, *25* (1), 1-4.

55. Tephly, T.; Coffman, B.; King, C.; Green, M.; Cheng, Z.; Rios, G., *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* 1997, 214, 6-TOXI.
56. Milne, R.; McLean, C.; Mather, L.; Nation, R.; Runciman, W.; Rutten, A.; Somogyi, A., *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1997, 282 (2), 779-786.
57. Carrupt, P.; Testa, B.; Bechalany, A.; Eltayyar, N.; Descas, P.; Perrissoud, D., *Journal of Medicinal Chemistry* 1991, 34 (4), 1272-1275.
58. Janzer, R.; Raff, M., *Nature* 1987, 325 (6101), 253-257.
59. Brunk, S.; Delle, M., *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 1974, 16 (1), 51-57.
60. Lasagna, L.; Dekornfeld, T., *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1958, 124 (3), 260-263.
61. Glare, P.; Walsh, T.; Pippenger, C., *Lancet* 1990, 335 (8691), 725-726.
62. Projean, D.; Morin, P.; Tu, T.; Ducharme, J., *Xenobiotica* 2003, 33 (8), 841-854.
63. Anderrsson, M.; Ekstrom, L.; Lena, B., 2014, 2.
64. Kurogi, K.; Chepak, A.; Hanrahan, M.; Liu, M.; Sakakibara, Y.; Suiko, M.; Liu, M., *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2014, 62, 40-48.
65. Brown, C.; Roerig, S.; Burger, V.; Cody, R.; Fujimoto, J., *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1985, 74 (8), 821-824.
66. Ohno, S.; Kawana, K.; Nakajin, S., *Drug Metabolism and Disposition* 2008, 36 (4), 688-694.
67. Vree, T.; Verweyvanwissen, C., *Biopharmaceutics & Drug Disposition* 1992, 13 (6), 445-460.
68. Cone, E.; Zichterman, A.; Heltsley, R.; Black, D.; Cawthon, B.; Robert, T.; Moser, F.; Caplan, Y., *Forensic Science International* 2010, 198 (1-3), 58-61.
69. Yeh, S., *Archives Internationales De Pharmacodynamie Et De Therapie* 1981, 254 (2), 223-240.
70. Yamazoe, Y.; KATO, R.; Numata, H.; Yanagita, T., *Folia Pharmacologica Japonica* 1979, 75 (5), P143-P143.
71. Bickel, M., *Pharmacological Reviews* 1969, 21 (4), 325-327.
72. Phillipson, J.; Handa, S.; Eldabbas, S., *Phytochemistry* 1976, 15 (8), 1297-1301.
73. Phillipson, J.; Handa, S.; Eldabbas, S., *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 1976, 28, P70-P70.
74. Heimans, R.; Fennessy, M.; Gaff, G., *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 1971, 23 (11), 831-832.
75. Woo, J.; Gaff, G.; Fennessy, M., *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 1968, 20 (10), 763-765.
76. Caldwell, G.; Gauthier, A.; Mills, J., *Magnetic Resonance in Chemistry* 1996, 34 (7), 505-511.

„Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli.“

Jméno a příjmení, adresa	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka